

## P/ ENT COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ISHIDA, Takashi  
A. Aoki, Ishida & Associates  
Toranomon 37 Mori Building  
5-1, Toranomon 3-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-8423  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 10 April 2000 (10.04.00)		IMPORTANT NOTIFICATION	
Applicant's or agent's file reference F873-PCT			
International application No. PCT/JP98/04518		International filing date (day/month/year) 06 October 1998 (06.10.98)	
1. The following indications appeared on record concerning: <input type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input checked="" type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative			
Name and Address 1) ISHIDA, Takashi 2) TSUCHIYA, Shigeru 3) TODA, Toshio 4) NISHIYAMA, Masaya 5) HIGUCHI, Sotoji A. Aoki & Associates Toranomon 37 Mori Building 5-1, Toranomon 3-chome Minato-ku Tokyo 105-8423 Japan		State of Nationality	State of Residence
		Telephone No. 03 5470-1900	
		Facsimile No. 03 5470 1911	
		Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence			
Name and Address 1) ISHIDA, Takashi 2) TSUCHIYA, Shigeru 3) TODA, Toshio 4) NISHIYAMA, Masaya 5) HIGUCHI, Sotoji A. Aoki, Ishida & Associates Toranomon 37 Mori Building 5-1, Toranomon 3-chome Minato-ku Tokyo 105-8423 Japan		State of Nationality	State of Residence
		Telephone No. 03 5470-1900	
		Facsimile No. 03 5470 1911	
		Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:			
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:			
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland		Authorized officer Shinji IGARASHI	
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35		Telephone No.: (41-22) 338.83.38	





PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

02 March 2000 (02.03.00)

International application No.:

PCT/JP99/04518

Applicant's or agent's file reference:

PH-681-PCT

International filing date:

23 August 1999 (23.08.99)

Priority date:

21 August 1998 (21.08.98)

Applicant:

TOMIZUKA, Kazuma et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

14 January 2000 (14.01.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38





## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification 5 :</b>  C12N 15/00	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> WO 94/02602  <b>(43) International Publication Date:</b> 3 February 1994 (03.02.94)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US93/06926 <b>(22) International Filing Date:</b> 23 July 1993 (23.07.93)  <b>(30) Priority data:</b> 07/919,297                      24 July 1992 (24.07.92)                      US 08/031,801                      15 March 1993 (15.03.93)                      US  <b>(71) Applicant:</b> CELL GENESYS, INC. [US/US]; 322 Lake-side Drive, Foster City, CA 94404 (US).  <b>(72) Inventors:</b> KUNCHERLAPATI, Raju; 8 Gracie Lane, Darien, CT 06820 (US). JAKOBOVITS, Aya; 1021 Monterey Avenue, Menlo Park, CA 94025 (US). KLA-PHOLZ, Sue; 76 Peter Coutts Circle, Stanford, CA 94305 (US). BRENNER, Daniel, G.; 86 Central Avenue, Redwood City, CA 94601 (US). CAPON, Daniel, J.; 90 Woodridge Road, Hillsborough, CA 94010 (US).		<b>(74) Agents:</b> BENZ, William, H. et al.; Morrison & Forester, 2000 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, DC 20006 (US).  <b>(81) Designated States:</b> AU, CA, FI, JP, KP, NO, NZ, Euro-pean patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i>
<b>(54) Title:</b> GENERATION OF XENOGENEIC ANTIBODIES  <b>(57) Abstract</b>  The subject invention provides non-human mammalian hosts characterized by inactivated endogenous Ig loci and functional human Ig loci for response to an immunogen to produce human antibodies or analogs thereof. The hosts are produced by multiple genetic modifications of embryonic cells in conjunction with breeding. Different strategies are employed for recombination of the human loci randomly or at analogous host loci. Chimeric and transgenic mammals, particularly mice, are provided, having stably integrated large, xenogeneic DNA segments. The segments are introduced by fusion with yeast spheroplasts comprising yeast artificial chromosomes (YACs) which include the xenogeneic DNA segments and a selective marker such as HPRT, and embryonic stem cells.		



**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	MR	Mauritania
AU	Australia	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	United Kingdom	NE	Niger
BE	Belgium	GN	Guinea	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	GR	Greece	NO	Norway
BG	Bulgaria	HU	Hungary	NZ	New Zealand
BJ	Benin	IE	Ireland	PL	Poland
BR	Brazil	IT	Italy	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Romania
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Sweden
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovak Republic
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	SN	Senegal
CN	China	LV	Latvia	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	MC	Monaco	TC	Togo
CZ	Czech Republic	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Germany	ML	Mali	US	United States of America
DK	Denmark	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistan
ES	Spain			VN	Viet Nam
FI	Finland				



## GENERATION OF XENOGENEIC ANTIBODIES

5

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

10           This application is a continuation-in-part of  
Application Serial No. 07/919,297 filed July 24, 1992  
which was a continuation-in-part of Application Serial  
No. 07/610,515 filed November 8, 1990 which was a  
continuation-in-part of Application Serial No. 07/466,008  
15       filed January 12, 1990, the entire disclosures of which  
are all incorporated herein by reference.

INTRODUCTIONTechnical Field

20           The field of this invention is the production of  
xenogeneic specific binding proteins in a viable mammalian  
host.

Background

25           The ability to produce transgenic animals has been  
revolutionized with the advent of the ability to culture  
murine embryonic stem cells, and to introduce genetic  
modifications in these cells for subsequent transmission  
to the mouse germline. Thus one has the opportunity to  
30       modify endogenous genes to produce animal strains capable  
of producing novel products by introduction of foreign  
genes into the host, particularly human genes to produce  
xenogeneic binding proteins. The expression of such genes  
in vivo in an animal model may provide for investigation  
35       of the function of the gene, the regulation of gene  
expression, its processing, response to various agents  
and the like. In addition, animals with new phenotypes,





including those that mimic a variety of diseases, may be produced. For example, there is interest in introducing a dominant mutation or complementing a recessive mutation. Depending on the particular gene, the difficulty of achieving the desired mutation will vary greatly. While some gene targets have proven to be relatively amenable to modification, other targets have proven to be extremely resistant to modification.

Because of the opportunity for generating transgenic animals, there is substantial interest in providing new procedures that increase the success of production of transgenic animals. Particularly, where one wishes to introduce large DNA fragments, encompassing hundreds of kilobases, there is substantial concern about the ability to introduce the large fragments in intact form into mammalian cells, the efficiency of integration, the functional capability of the gene(s) present on the fragment and transmission in the germline to the progeny. In addition, such procedures for introduction of large DNA fragments provide for determination of the function of large DNA fragments identified in the ongoing human genome project.

In particular, there is interest in producing xenogeneic specific binding proteins, for example human monoclonal antibodies, in small laboratory animals such as mice. Monoclonal antibodies find use in both diagnosis and therapy. Because of their ability to bind to a specific epitope, they can be uniquely used to identify molecules carrying that epitope or may be directed, by themselves or in conjunction with another moiety, to a specific site for diagnosis or therapy.

Monoclonal antibodies comprise heavy and light chains which join together to define a binding region for the epitope. Each of the chains is comprised of a variable region and a constant region. The constant region amino acid sequence is specific for a particular isotype of the antibody, as well as the host which produces the antibody.



Because of the relationship between the sequence of the constant region and the species from which the antibody is produced, the introduction of a xenogeneic antibody into the vascular system of the host can produce an immune response. Where the xenogeneic antibody is introduced repetitively, in the case of chronic diseases, it becomes impractical to administer the antibody, since it will be rapidly destroyed and may have an adverse effect. There have been, therefore, many efforts to provide a source of syngeneic or allogeneic antibodies. One technique has involved the use of recombinant DNA technology where the genes for the heavy and light chains from a host were identified and the regions encoding the constant region isolated. These regions were then joined to the variable region encoding portion of other immunoglobulin genes from another species directed to a specific epitope.

While the resulting chimeric partly xenogeneic antibody is substantially more useful than using a fully xenogeneic antibody, it still has a number of disadvantages. The identification, isolation and joining of the variable and constant regions requires substantial work. In addition, the joining of a constant region from one species to a variable region from another species may change the specificity and affinity of the variable regions, so as to lose the desired properties of the variable region. Also, there are framework and hypervariable sequences specific for a species in the variable region. These framework and hypervariable sequences may result in undesirable antigenic responses.

It would therefore be more desirable to produce allogeneic antibodies for administration to a host by immunizing the host with an immunogen of interest. For primates, particularly humans, this approach is not practical. The human antibodies which have been produced have been based on the adventitious presence of an available spleen, from a host which had been previously



immunized to the epitope of interest. While human peripheral blood lymphocytes may be employed for the production of monoclonal antibodies, these have not been particularly successful in fusions and have usually led only to IgM. Moreover, it is particularly difficult to generate a human antibody response against a human protein, a desired target in many therapeutic and diagnostic applications. There is, therefore, substantial interest in finding alternative routes to the production of allogeneic antibodies for humans.

#### Relevant Literature

Thomas and Capecchi (1987), Cell, 51:503-512 and Koller and Smithies (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932-8935 describe inactivating the  $\beta 2$ -microglobulin locus by homologous recombination in embryonic stem cells. Berman et al. (1988), EMBO J. 7:727-738 describe the human Ig VH locus. Burke, et al. (1987), Science, 236:806-812 describe yeast artificial chromosome vectors. See also, Garza et al. (1989), Science, 246:641-646 and Brownstein et al. (1989), Science, 244:1348-1351. Sakano, et al., describe a diversity segment of the immunoglobulin heavy chain genes in Sakano et al. (1981), Nature, 290:562-565. Tucker et al. (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:7684-7688 describe the mouse IgA heavy chain gene sequence. Blankenstein and Kruwinkels (1987), Eur. J. Immunol., 17:1351-1357 describe the mouse variable heavy chain region. See also, Joyner et al. (1989), Nature, 338:153-155, Traver et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:5898-5902, Pachtis et al. (1990), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87:5109-5113 and PCT application PCT/US91/00245. Bruggemann et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 86:6709-6713 (1989); Behring Inst. Mitt. 87:21-24 (1990); Eur. J. Immunol. 21:1323-1326 (1991), describe monoclonal antibodies with human heavy chains. Albertsen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:4256-4260 (1990), describe the construction of a library of yeast artificial



chromosomes containing human DNA fragments. Yeast artificial chromosome vectors are described by Burke et al., Science 236:806-812 (1987). Pavan et al., Mol. and Cell. Biol. 10(8):4163-4169 (1990) describe the introduction of a neomycin resistance cassette into the human-derived insert of a yeast artificial chromosomes using homologous recombination and transfer into an embryonal carcinoma cell line using polyethylene glycol-mediated spheroplast fusion. Pachnis et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:5109-5113 (1990), and Gnirke et al., EMBO Journal 10(7):1629-1634 (1991), describe the transfer of a yeast artificial chromosome carrying human DNA into mammalian cells. Eliceiri et al., Proc. Nat. Acad. USA 88:2179-2183 (1991), describe the expression in mouse cells of yeast artificial chromosomes containing human genes. Huxley et al., Genomics 9:742-750 (1991) describe the expression in mouse cells of yeast artificial chromosomes containing the human HPRT gene. Mortensen et al., Mol. and Cell. Biol. 12(5):2391-2395 (1992) describe the use of high concentrations of G418 to grow heterozygous embryonic stem cells for selection of homozygous mutationally altered cells. Yeast protoplast fusion with mouse fibroblasts is described by Traver et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:5898-5902 (1989) and Pachnis et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:5109-5113 (1990). Davies et al., Nucl. Acids Res. 20:2693-2698 (1992) describe targeted alterations in YACs. Zachau, Biol. Chem. 371:1-6 (1990) describes the human immunoglobulin light (kappa) (IgK) locus; Matsuda et al., Nature Genetics 3:88-94 (1993) and Shin et al., EMBO 10:3641-3645 (1991) describe the cloning of the human immunoglobulin heavy (IgH) locus in YACs.





SUMMARY OF THE INVENTION

5 Xenogeneic specific binding proteins are produced in a non-human viable host by immunization of the host with an appropriate immunogen.

10 A preferred non-human host is characterized by: (1) being incapable of producing endogenous immunoglobulin heavy chain; (2) being substantially incapable of producing endogenous immunoglobulin light chains; and (3) capable of producing xenogeneic immunoglobulin light and heavy chains to produce a xenogeneic immunoglobulin or immunoglobulin analog. Thus, the host may have an entire endogenous immunoglobulin locus substituted by a portion of, or an entire, xenogeneic immunoglobulin locus, or may have a xenogeneic immunoglobulin locus inserted into a chromosome of the host cell and an inactivated endogenous immunoglobulin region. These various alternatives will be achieved, at least in part, by employing homologous recombination for inactivation or replacement at the immunoglobulin loci for the heavy and light chains.

20 Additionally, novel methods are provided for introducing large segments of xenogeneic DNA of at least 100 kb, particularly human DNA, into host animals, particularly mice, by introducing a yeast artificial chromosome (YAC) containing a xenogeneic DNA segment of at least 100 kb, into an embryonic stem cell for integration into the genome of the stem cell, selection of stem cells comprising the integrated YAC by means of a marker present in the YAC, introduction of the YAC-containing ES cells into embryos and generation of chimeric mice from the embryos. The chimeric animals may be mated to provide animals that are heterozygous for the YAC. The heterozygous animals may be mated to generate progeny homozygous for the integrated YAC.

35



DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a diagram of the inactivation vector for the mouse heavy chain J region, as described in Example I, infra.

5        Figure 2 is a diagram of the DNA restriction map for the plasmid pmHδJ and the targeted mouse heavy chain J genes, as described in Example II, infra.

10       Figure 3 is a flow cytometry plot of antibody staining for IgM allotypes in mouse strains, as described in Example II, infra.

Figure 4 is a flow cytometry histogram of antibody staining for IgM allotypes in mouse strains, as described in Example II, infra.

15       Figure 5 is a diagram of the inactivation vector for the mouse immunoglobulin kappa constant region genes, as described in Example III, infra.

Figure 6 is a diagram of the derivation of the plasmid pK.TK/Neo, as described in Example III, infra.

20       Figure 7 is a diagram of the restriction map of the light chain targeted locus, as described in Example III, infra.

25       Figure 8 is a diagram of the targeting vector for inactivation of the kappa light chain J and constant regions and design of the targeting experiment as described in Example IV, infra.

Figure 9 is a diagram of the construction of vectors for inactivating the kappa light chain J and constant regions as described in Example IV, infra.



Figure 10 is a diagram of the final deletion vectors for inactivation of the kappa light chain J and constant regions as described in Example IV, infra.

5 Figure 11 is an illustration of the Southern analysis of light chain J and constant region deleted cells as described in Example IV, infra.

10 Figure 12 A-E are photographs of the results of Southern blot analysis to characterize yHPRT and yeast genomic DNA integrated in ES clones as described in Example VI, infra (A = human repetitive Alu sequence; B,C = pBR322-specific sequences for the right (B) and left (C) YAC arms; D = yeast Ty repetitive sequence; E = yeast single copy gene LYS2. Shorter exposure times (12 hrs for II as compared to 48 hrs for I) of yHPRT probed with Alu and Ty sequences also are also shown. Positions of molecular weight markers are indicated. Schemes of right (a) and left (b) vector arms and the locations of pBR322-derived YAC vector fragments are shown ( = telomere; = yeast-derived sequences; 0 = yeast centromere; = pBR322-derived sequences; = human insert; = EcoRI cloning site; H = HindIII sites).

15  
20

25 Figure 13 A-D are photomicrographs of the results of in situ hybridization to detect integration of yHPRT and yeast genomic sequences in ES cell chromosomes as described in Example VI, infra (A, B =metaphase spreads from ESY 8-7 cells hybridized to biotinylated human genomic sequences and C = metaphase spreads or D = interphase nuclei from ESY 8-6 cells hybridized to biotinylated yeast repeated DNA sequences).



Figure 14 A, B, C demonstrates the stable retention of yHPRT during in vitro ES cell differentiation and transmission through the mouse germline, as described in Example VI, infra (A: a, b = embryoid bodies; and differentiated cell types: c = blood islands; d=contracting muscle; e= neuronal cells; f = neural tubules formed by ESY clones; B: Southern blot analysis of DNA extracted from differentiated ESY 5-2, 3-6, 8-5 and 8-6 (20  $\mu$ g) and yHPRT in AB1380 (40 ng) using a = human Alu probe; b = yeast Ty sequences; C: Southern blot analysis of tail DNA (20  $\mu$ g) from 2 agouti offspring (4-2 and 4-3) derived from ESY chimeric male 394/95-2 using a = human Alu and b = Ty sequences; shorter exposures (12 hr) of 8-6 and yHPRT probed with Ty are shown (II)).

Figure 15 A and B are a photograph of an electrophoresis gel showing the expression of the human HPRT gene in various mouse tissues, as described in Example VI, infra (15 A = detection of human HPRT mRNA using reverse transcription-PCR in ES, ESY 3-1 and Hut 78 cells, spleen and liver from control mice or ESY 4-3 agouti offspring; 15 B = detection of mouse  $\gamma$ -interferon receptor mRNA by RT-PCR in samples from 15 A; M = size marker).

Figure 16 is a diagram of the human immunoglobulin heavy chain locus, and a human heavy chain replacement YAC vector, as described in Example VII, infra.

Figure 17 is a diagram of a mouse breeding scheme, as described in Example VIII, infra.

Figure 18 depicts the genotypes of some of the host animals produced by the methods of the invention.





DESCRIPTION OF SPECIFIC EMBODIMENTS

Novel transgenic non-human hosts, particularly mammalian hosts, usually murine, are provided, where the host is capable of mounting an immune response to an immunogen, where the response produces antibodies having xenogeneic, particularly primate, and more particularly human, constant and/or variable regions or such other effector peptide sequences of interest. By "transgenic" is meant an animal that contains a genetically engineered modification, particularly, as to this invention, the introduction of a human immunoglobulin gene, in all of its cells. The hosts are characterized by being capable of producing xenogeneic immunoglobulins or analogs thereof as a result of inactivation of the endogenous immunoglobulin subunit encoding loci and introduction of xenogeneic DNA, for example DNA encoding human immunoglobulin. The modifications may retain at least a portion of the xenogeneic constant regions which provide for assembly of the variable region binding site bonded at the C-terminus to a functional peptide. The functional peptide may take many forms or conformations and may serve as an enzyme, growth factor, binding protein, ligand, cytokine, effector protein, chelating proteins, etc. The antibodies may be of any isotype, e.g., IgA, D, E, G or M or subtypes within the isotype.

In a first strategy, as individual steps, the xenogeneic, e.g. human, heavy and light chain immunoglobulin genes are introduced into the host germ line (e.g. sperm or oocytes) and in separate steps the corresponding host genes are rendered non-functional by inactivation using homologous recombination. Human heavy and light chain immunoglobulin genes are reconstructed in an appropriate eukaryotic or prokaryotic microorganism and the resulting DNA fragments can be introduced into the appropriate host, for example into the pronuclei of fertilized mouse oocytes or embryonic stem cells.



Inactivation of the endogenous host immunoglobulin loci is achieved by targeted disruption of the appropriate loci by homologous recombination in the host cells, particularly embryonic stem cells or pronuclei of fertilized mouse oocytes. The targeted disruption can involve introduction of a lesion or deletion in the target locus, or deletion within the target locus accompanied by insertion into the locus, for example, insertion of a selectable marker. In the case of embryonic stem cells, chimeric animals are generated which are derived in part from the modified embryonic stem cells and are capable of transmitting the genetic modifications through the germ line. The mating of hosts with introduced human immunoglobulin loci to strains with inactivated endogenous loci will yield animals whose antibody production is purely xenogeneic, e.g. human.

In a second, alternative strategy, at least portions of the human heavy and light chain immunoglobulin loci are used to directly replace the corresponding endogenous immunoglobulin loci by homologous recombination in embryonic stem cells. This results in simultaneous inactivation and replacement of the endogenous immunoglobulin. This is followed by the generation of chimeric animals in which the embryonic stem cell-derived cells can contribute to the germ line.

These strategies are based on the known organization of the immunoglobulin chain loci in a number of animals, since the organization, relative location of exons encoding individual domains, and location of splice sites and transcriptional elements is understood to varying degrees. In the human, the immunoglobulin heavy chain ( $IgH_{hu}$ ) locus is located on chromosome 14. In the 5' - 3' direction of transcription, the locus comprises a large cluster of variable region genes ( $V_H$ ), the diversity (D) region genes, followed by the joining ( $J_H$ ) region genes and the constant ( $C_H$ ) gene cluster. The size of the locus is estimated to be about from 1,500 to about 2,500



kilobases (kb). During B-cell development, discontinuous gene segments from the germ line IgH locus are juxtaposed by means of a physical rearrangement of the DNA. In order for a functional heavy chain Ig polypeptide to be produced, three discontinuous DNA segments, from the V<sub>H</sub>, D, and J<sub>H</sub> regions must be joined in a specific sequential fashion; first D to J<sub>H</sub> then V<sub>H</sub> to DJ<sub>H</sub>, generating the functional unit V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>. Once a V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> has been formed, specific heavy chains are produced following transcription of the Ig locus, utilizing as a template the specific V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>C<sub>H</sub> unit comprising exons and introns.

There are two loci for immunoglobulin light chains (IgL), the kappa locus on human chromosome 2 and the lambda locus on human chromosome 22. The organization of the IgL loci is similar to that of the IgH locus, except that the D region is not present. Following IgH rearrangement, rearrangement of a light chain locus is similarly accomplished by V<sub>L</sub> to J<sub>L</sub> joining of the kappa or lambda chain. The sizes of the lambda and kappa loci are each approximately 1000 kb to 2000 kb. Expression of rearranged IgH and an Igκ or Igλ light chain in a particular B-cell allows for the generation of antibody molecules.

In order to isolate, clone and transfer the IgH<sub>hu</sub> locus, a yeast artificial chromosome or "YAC" may be employed. A YAC carrying the xenogeneic DNA may be introduced into ES cells or oocytes by a variety of methods, including yeast spheroplast: ES cell fusion, microinjection and lipofection. The YAC will integrate randomly (i.e. non-homologously) into the host genome. If yeast spheroplast:ES cell fusion is employed to introduce a YAC carrying xenogeneic DNA into ES host cells, then two or more YACs in a single yeast host cell may be introduced simultaneously into the same host ES cell. The advantage of this approach is that multiple YACs each containing xenogeneic DNA, for example human heavy and light chain immunoglobulin loci, can be introduced



into a single chromosome in a host cell. This eliminates the need for breeding of animals containing individual human Ig genes in order to generate a host capable of producing fully human immunoglobulins. For example, a strain of yeast containing a single YAC is targeted with a vector such as pLUTO (described infra) to introduce a mammalian selectable marker such as HPRT, and a yeast selectable marker such as LYS2 into an arm of the YAC. Chromosomal DNA from the targeted strain is then used to transform a second, usually haploid, lys2 mutant yeast strain containing a second, different YAC. Lys+ colonies are then analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to identify clones harboring the two YACs and to confirm that they are unaltered in size. Additional YACs with different selectable markers, for example ADE2 (if the host is an ade2 mutant), can subsequently be added by transformation. Alternatively, a YAC-containing strain of yeast is targeted with a vector such as pLUTO to introduce a mammalian selectable marker (e.g. HPRT), as above, and then mated to a second YAC-containing strain of opposite mating type. The presence of the two YACs is then confirmed in the diploid yeast cells as described above. The diploid yeast strain is used directly for fusion or put through meiosis and ascosporeogenesis (sporulation) using standard procedures. The meiotic products are then screened to identify a haploid clone containing the two YACs. With either approach described above, the second YAC can be targeted with HPRT or another selectable marker prior to introduction of the first YAC. Also, if each YAC contains a different yeast selectable marker, maintenance of both YACS during strain propagation may be genetically selected. Fusion with ES cells is then carried out in the same manner as with yeast cells containing a single YAC. Because many yeast chromosomes may integrate along with the YAC, it is expected that a substantial portion of ES clones expressing the mammalian selectable marker present in one YAC (e.g. HAT<sup>R</sup> clones





if the YAC marker is HPRT, and the ES cells are HPRT-), will have integrated both YACs. Methods such as Southern analysis and/or PCR may be used to identify such clones, and Southern analysis employing pulsed-field gel electrophoresis used to characterize the extent of YAC integration.

The entire IgH<sub>μ</sub> locus can be contained within one or a few YAC clones along with a mammalian marker such as Neo, HPRT, GPT, β-gal, etc. The same is true for the Ig light chain loci. Reconstitution of intact germ line Ig loci by homologous recombination between YACs with overlapping regions of homology can be achieved in yeast.. In this manner, the isolation of DNA fragments encoding the human Ig chain is obtained. Alternatively, one can directly clone an intact germline locus in a single YAC.

In order to obtain a broad spectrum of high affinity antibodies, it is not necessary that one include the entire V region. Various V region gene families are interspersed within the V region cluster in humans. Thus, by obtaining a subset of the known V region genes of the human heavy and light chain Ig loci (Berman *et al.*, EMBO J. (1988) 7:727-738) rather than the entire complement of V regions, the transgenic host may be immunized and be capable of mounting a strong immune response and provide high affinity antibodies. In this manner, relatively small DNA fragments of the chromosome may be employed. For example, a reported 670 kb fragment of the IgH<sub>μ</sub> locus is contained on a NotI-NotI restriction fragment, which would serve to provide a variety of V regions (Berman *et al.*, *supra*). Increased diversity is also provided by recombination with the various D and J regions and somatic mutation.

To render the host immunoglobulin loci non-functional, homologous recombination may be employed, where DNA is introduced at the endogenous host immunoglobulin heavy chain and light chain loci which inhibits the production of endogenous immunoglobulin.



Because there are two heavy chain alleles and two light chain loci, kappa and lambda, each with two alleles, although one may choose to ignore the lambda loci, there will have to be multiple transformations which result in inactivation of each of the alleles. Homologous recombination may be employed to functionally inactivate each of the loci, by introduction of the homologous DNA via a construct that can disrupt or delete the target locus into embryonic stem cells, followed by introduction of the modified cells into recipient blastocysts. Subsequent breeding allows for germ-line transmission of the inactivated locus. One can therefore choose to breed heterozygous offspring and select for homozygous offspring from the heterozygous parents.

In the second, alternative strategy described above, the number of steps may be reduced by providing at least a fragment of the human immunoglobulin locus within the construct used for homologous recombination with the analogous endogenous immunoglobulin, so that the human locus is substituted for at least a part of the host immunoglobulin locus, with resulting inactivation of the host immunoglobulin subunit locus. Of particular interest is the use of transformation for a single inactivation, followed by breeding of the heterozygous offspring to produce a homozygous offspring. Where the human locus is employed for substitution or insertion into the host locus for inactivation, the number of transformations may be limited to three transformations and as already indicated, one may choose to ignore the less used locus and limit the transformations to two transformations. Alternatively, one may choose to provide for inactivation as a separate step for each locus, employing embryonic stem cells from offspring which have previously had one or more loci inactivated. In the event that only transformation is used and the human locus is integrated into the host genome in random fashion, a total of eight or more transformations may be required.



For inactivation, any lesion in the target locus resulting in the prevention of expression of an immunoglobulin subunit of that locus may be employed. Thus, the lesion may be in a region comprising enhancers, e.g., a 5' or 3' enhancer, or intron, in the V, J or C regions, and with the heavy chain, the opportunity exists in the D region, or combinations thereof. The important factor is that Ig germ line gene rearrangement is inhibited, or a functional message encoding the endogenous immunoglobulin cannot be produced, either due to failure of transcription, failure of processing of the message, or the like. Such a lesion may take the form of a deletion in the target gene, an insertion of a foreign gene, a combination of an insertion and deletion, or a replacement using xenogeneic sequences with or without introduction of a deletion in the endogenous gene.

Preferably, when one is interested in inactivating the immunoglobulin subunit locus, the lesion will be introduced into one or more of the exons contained in the immunoglobulin subunit locus, for example in the constant or J region of the locus. Thus, one produces a targeting construct which lacks functional exons in this region and may comprise the sequences adjacent to and upstream and/or downstream from the J and/or C region or comprises all or part of the region with an inactivating insertion in the J or C exons. The insertion may be 50 bp or more, where such an insertion results in disruption of formation of a functional mRNA. Desirably, usually at least about 75% of the exon sequence, preferably at least about 90% of the exon sequence, is deleted.

Desirably, a marker gene is used in the targeting construct to replace the deleted sequences. Various markers may be employed, particularly those which allow for positive selection. Of particular interest is the use of G418 resistance, resulting from expression of the gene for neomycin phosphotransferase ("neo").



5 In the targeting construct, upstream and/or downstream from the target gene, may be a gene which provides for identification of whether a homologous double crossover has occurred (negative selection). For this purpose, the Herpes simplex virus thymidine kinase gene may be employed, since cells expressing the thymidine kinase gene may be killed by the use of nucleoside analogs such as acyclovir or gancyclovir, by their cytotoxic effects on cells that contain a functional HSV-tk (Mansour et al., Nature 336:348-352 (1988)). The absence of sensitivity to these nucleoside analogs indicates the absence of the HSV-thymidine kinase gene and, therefore, where homologous recombination has occurred, that a double crossover has also occurred.

15 While the presence of the marker gene in the genome will indicate that integration has occurred, it will still be necessary to determine whether homologous integration has occurred. This can be achieved in a number of ways. For the most part, DNA analysis by Southern blot hybridization will be employed to establish the location of the integration. By employing probes for the insert and the sequences at the 5' and 3' regions flanking the region where homologous integration would occur, one can demonstrate that homologous targeting has occurred.

20 PCR may also be used with advantage in detecting the presence of homologous recombination. PCR primers may be used which are complementary to a sequence within the targeting construct and complementary to a sequence outside the construct and at the target locus. In this way, one can only obtain DNA molecules having both the primers present in the complementary strands if homologous recombination has occurred. By demonstrating the expected size fragments, e.g. using Southern blot analysis, the occurrence of homologous recombination is supported.

35 The targeting construct may further include a replication system which is functional in the host cell. For the most part, these replication systems will involve





viral replication systems, such as Simian virus 40, Epstein-Barr virus, polyoma virus, papilloma virus, and the like. Various transcriptional initiation systems may be employed, either from viruses or from mammalian genes, such as SV40, metallathionein-I and II genes,  $\beta$ -actin gene, adenovirus early and late genes, phosphoglycerate kinase gene, RNA polymerase II gene, or the like. In addition to promoters, wild-type enhancers may be employed to further enhance the expression of the marker gene.

In preparing the targeting constructs for homologous recombination, a replication system for procaryotes, particularly E. coli, may be included for preparing the targeting construct, subcloning after each manipulation, analysis such as restriction mapping or sequencing, expansion and isolation of the desired sequence. In the case of the replacement strategy, where the xenogeneic DNA insert is large, generally exceeding about 50 kbp, usually exceeding 100 kbp, and usually not more than about 1000 kbp, a yeast artificial chromosome (YAC) may be used for cloning of the targeting construct.

Once a targeting construct has been prepared and any undesirable sequences removed, e.g., procaryotic sequences, the construct may now be introduced into the target cell, for example an ES cell. Any convenient technique for introducing the DNA into the target cells may be employed. Techniques include protoplast fusion, e.g. yeast spheroplast:cell fusion, lipofection, electroporation, calcium phosphate-mediated DNA transfer or direct microinjection.

After transformation or transfection of the target cells, target cells may be selected by means of positive and/or negative markers, as previously indicated, neomycin resistance and acyclovir or gancyclovir resistance. Those cells which show the desired phenotype may then be further analyzed by restriction analysis, electrophoresis, Southern analysis, PCR, or the like. By identifying fragments which show the presence of the lesion(s) at the



target locus, one can identify cells in which homologous recombination has occurred to inactivate a copy of the target locus.

5 The above described process may be performed first to inactivate a heavy chain locus in an embryonic stem cell whereby the cells are microinjected into host blastocysts which develop into a chimeric animal. The chimeric animals are bred to obtain heterozygous hosts. Then, by breeding of the heterozygous hosts, a homozygous  
10 host may be obtained or embryonic stem cells may be isolated and transformed to inactivate the second IgH locus, and the process repeated until all the desired loci have been inactivated. Alternatively, the light chain locus may be the first to be inactivated. For complete  
15 elimination of the ability to produce light chain immunoglobulin, it is desirable to inactivate both the lambda and the kappa light chain immunoglobulin loci. At any stage, the xenogeneic loci may be introduced.

As already indicated, the target locus may be  
20 substituted with the analogous xenogeneic locus. In this way, the xenogeneic locus will be placed substantially in the same region as the analogous host locus, so that any regulation associated with the position of the locus will be substantially the same for the xenogeneic  
25 immunoglobulin locus. For example, by isolating the variable region of the human IgH locus (including V, D, and J sequences), or portion thereof, and flanking the human locus with sequences from the murine locus, preferably sequences separated by at least about 5 kbp,  
30 in the host locus, preferably at least about 10 kbp in the host locus, one may insert the human fragment into this region in a recombinational event(s), substituting the human immunoglobulin locus for the endogenous variable region of the host immunoglobulin locus. In this manner,  
35 one may disrupt the ability of the host to produce an endogenous immunoglobulin subunit, while allowing for the promoter of the human immunoglobulin locus to be activated



by the host enhancer and regulated by the regulatory system of the host.

5 In order to provide for the production of xenogeneic binding proteins in a host, it is necessary that the host be competent to provide the necessary enzymes and other factors involved with the production of antibodies, while lacking competent endogenous genes for the expression of heavy and light subunits of immunoglobulins. Thus, those enzymes and other factors associated with germ line  
10 rearrangement, splicing, somatic mutation, and the like will be functional in the host. What will be lacking is a functional natural region comprising the various exons associated with the production of endogenous immunoglobulin.

15 The integration of introduced xenogeneic DNA may be random or homologous depending on the particular strategy to be employed. Thus, by using transformation, using repetitive steps or in combination with breeding, transgenic animals may be obtained which are able to produce xenogeneic binding proteins in the substantial  
20 absence of light or heavy endogenous immunoglobulin. By transformation is intended any technique for introducing DNA into a viable cell, such as conjugation, PEG-mediated cell fusion, transformation, transfection, transduction, electroporation, lipofection, biolistics, or the like.  
25

Once the xenogeneic loci, have been introduced into the host genome, either by homologous recombination or random integration, and host animals have been produced with the endogenous immunoglobulin loci inactivated by appropriate breeding of the various transgenic animals  
30 or animals derived from chimeric animals, one can produce a host which lacks the native capability to produce endogenous immunoglobulin, but has the capacity to produce xenogeneic immunoglobulins with at least a significant portion of the repertoire of the xenogeneic source.  
35

The functional inactivation of the two copies of each of the three host Ig loci (heavy, kappa and lambda), where



the host then contains the human IgH and the human Ig kappa and/or lambda loci would allow for the production of purely human antibody molecules without the production of host or host/human chimeric antibodies. Such a host strain, by immunization with specific antigens, would respond by the production of murine B-cells producing specific human antibodies, which B-cells could be fused with murine myeloma cells or be immortalized in any other manner for the continuous stable production of human monoclonal antibodies. Methods are well known in the art for obtaining continuous stable production of monoclonal antibodies.

The subject methodology and strategies need not be limited to producing complete immunoglobulins, but provides the opportunity to provide for regions joined to a portion of the constant region, e.g.,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ , or  $C_{H4}$ , or combination thereof. Alternatively, one or more of the exons of the  $C_H$  and  $C_L$  or  $C_\lambda$  regions may be replaced or joined to a sequence encoding a different protein, such as an enzyme, e.g., plasminogen activator, superoxide dismutase, etc.; toxin, e.g., ricin, abrin, diphtheria toxin, etc.; growth factor; cytotoxic agent, e.g., TNF; receptor ligand, or the like. See, for example, WO 89/07142; WO 89/09344; and WO 88/03559. By inserting the protein of interest into a constant region exon and providing for splicing of the variable region to the modified constant region exon, the resulting binding protein may have a different C-terminal region from the immunoglobulin. By providing for a stop sequence with the inserted gene, the protein product will have the inserted protein as the C-terminal region. If desired, the constant region may be entirely substituted by the other protein, by providing for a construct with the appropriate splice sites for joining the variable region to the other protein.

The B-cells from the transgenic host producing immunoglobulin or immunoglobulin analog may be used for





fusion to a murine myeloid cell to produce hybridomas or immortalized by other conventional process, e.g., transfection with oncogenes. These immortalized cells may then be grown in continuous culture or introduced into the peritoneum of a compatible host for production of ascites.

The subject invention provides for the production of polyclonal human anti-serum or human monoclonal antibodies or antibody analogs. Where the mammalian host has been immunized with an immunogen, the resulting human antibodies may be isolated from other proteins by using an affinity column, having an Fc binding moiety, such as protein A, or the like.

The invention includes the following embodiments of non-human hosts (see also Figure 18):

I. Animals heterozygous for an inactive endogenous light chain immunoglobulin gene (homozygous animals are obtained by interbreeding);

II. Animals heterozygous for an inactive endogenous heavy chain immunoglobulin gene (homozygous animals are obtained by interbreeding);

III. Animals homozygous for functional endogenous light and heavy chain immunoglobulin genes and hemizygous for (i.e. containing one copy of) foreign, preferably human, heavy chain immunoglobulin genes (homozygous animals are obtained by interbreeding);

IV. Animals homozygous for functional endogenous light and heavy chain immunoglobulin genes and hemizygous for foreign, preferably human, light chain immunoglobulin genes (homozygous animals are obtained by interbreeding);

V. Animals heterozygous for inactive endogenous heavy and light chain immunoglobulin genes obtained by crossbreeding animals of category I with animals from category II (homozygous animals are obtained by interbreeding);



5 VI. Animals heterozygous for inactive endogenous heavy and light chain immunoglobulin genes and hemizygous for foreign, preferably human, heavy chain immunoglobulin genes obtained by crossbreeding animals of category III with animals from category V (animals homozygous for the inactive endogenous loci and homo- or hemizygous for the foreign gene are obtained by interbreeding);

10 VII. Animals heterozygous for inactive endogenous heavy and light chain immunoglobulin genes and hemizygous for foreign, preferably human, light chain immunoglobulin genes obtained by crossbreeding animals of category IV with animals from category V (animals homozygous for the inactive endogenous loci and homo- or hemizygous for the foreign gene are obtained by interbreeding);

15 VIII. Animals homozygous or heterozygous for inactive endogenous heavy and light chain immunoglobulin genes and hemizygous for foreign, preferably human, light and heavy chain immunoglobulin genes, obtained by crossbreeding animals of category VI and VII (animals homozygous for the inactive endogenous loci and homo- or hemizygous for the foreign gene are obtained by interbreeding);

20 In a preferred embodiment, the homozygous animals of category VIII are used to produce human antibodies.

25 IX. Animals homozygous for functional endogenous heavy and light chain immunoglobulin genes and hemizygous for foreign, preferably human, heavy and light chain immunoglobulin genes, obtained by crossbreeding animals of category III and IV (homozygous animals are obtained by interbreeding);

30 X. Animals heterozygous for an inactive endogenous heavy chain immunoglobulin gene and hemizygous for foreign, preferably human, heavy and light chain immunoglobulin genes, obtained by crossbreeding animals of category II and IX (animals homozygous for the inactive endogenous loci and homo- or hemizygous for the foreign gene are obtained by interbreeding).



XI. Animals heterozygous for an inactive endogenous light chain immunoglobulin gene and hemizygous for foreign, preferably human, heavy and light chain immunoglobulin genes, obtained by crossbreeding animals of category I and IX (animals homozygous for the inactive endogenous loci and homo- or hemizygous for the foreign gene are obtained by interbreeding).

The invention also provides a method for introducing large continuous, xenogeneic DNA sequences into a non-human, e.g. mammalian, host. Usually, the sequences will be at least 100 kb, more usually at least about 200 kb, generally ranging from about 200 to 1000 kb. Thus, one may wish to transfer a locus of interest, such as the immunoglobulin locus, T-cell receptor locus, major histocompatibility locus; regions of an xenogeneic chromosome, which may include one or more genes of interest, which may or may not have been characterized, such as the Low Density Lipoprotein (LDL) receptor, Apolipoprotein (Apo) B, Apo E, cystic fibrosis transmembrane conductor regulator, dystrophin, or regions of xenogeneic chromosomes that may be involved in partial chromosome trisomy (e.g. chromosomes 21, 7 and 10); and viruses. The DNA may comprise wild type or defective genes for studying a variety of diseases by creating dominant mutations or complementing recessive mutations, for example the LDL receptor and Apo B genes can be introduced for the study of hypercholesterolemia, hyperlipoproteinemia and atherosclerosis, Factor VIII or IX can be introduced for hemophilia, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator can be introduced for cystic fibrosis and the dystrophin gene for muscular dystrophy. The xenogeneic DNA to be introduced using a YAC is from a mammalian source, particularly primates, more particularly human, other vertebrates or invertebrates and the like. One can thus impart numerous novel capabilities to the host, create genetic responses related to the xenogeneic source of the DNA, provide for



the production of antibodies, provide for specific combinations of transcription factors, provide for metabolic systems, introduce dominant mutations or complement recessive mutations. The xenogeneic DNA may be modified when present in a YAC. Because homologous recombination is efficient in yeast, giving a high ratio of site-specific integration of homologous DNA, where the homologous DNA flanks other DNA of interest, one is able to modify the xenogeneic DNA before introduction into an ES cell. In this way, one can introduce defective genes into the host which express defective proteins to mimic diseased states of the xenogeneic host, to study various mechanisms of the interaction of defective proteins with other xenogeneic proteins or endogenous proteins, or to study genes or gene systems.

In general, to transfer large DNA segments, as described in detail herein, YACs are employed which comprise a yeast centromere, an origin of replication and telomeres bounding the DNA of interest. Various centromeres or telomeres may be used, particularly the centromeres from yeast chromosomes 4 and 5. The YAC has a marker which allows for selection or screening of cells into which the YAC becomes integrated. Not all markers allow for efficient selection. Particularly, the HPRT gene, more particularly human HPRT, is found to permit efficient selection of HPRT-deficient ES cells carrying the YAC. Other known selectable or screenable markers include hygromycin, neomycin,  $\beta$ -gal, and GPT. The ES cell may be derived from any non-human host, from which ES cells are available, and can be expanded in culture, which remain viable and functional, for which a marker for selection exists, and where the ES cell can be introduced into an embryo and can repopulate the host, including the germline. For the most part this capability has been established with rodents, e.g. mice and rats, and to a lesser extent with guinea pigs. Mice have been used for the production of antibodies or B-lymphocytes for





immortalization for the production of antibodies. Because mice are easy to handle, can be produced in large quantities, and are known to have an extensive immune repertoire, mice will usually be the animal of choice.

5 As other species of ES cells become available, these may also be employed in accordance with the subject invention. Of particular interest will be small laboratory animals, or domestic animals particularly rodents, including mice, rats, rabbits, cows, pigs, hamsters, horses, dogs, sheep

10 and guinea pigs, or birds such as chickens, turkeys, etc. The ES cells may have one or more mutations, for example lacking a particular activity. Of particular interest in this invention are ES cells that are deficient in HPRT. In addition, fertilized eggs of certain species may find

15 use in accordance with the invention.

The YAC may be obtained by screening existing human YAC libraries such as those available from the Centre d'Etude du Polymorphisme Human (C.E.P.H.), Paris, France, and Washington University, St. Louis, MO, using standard

20 procedures. Alternatively, the YAC is readily prepared as described in detail herein, by joining the yeast flanking segments comprising one arm with a centromere and telomere and another with a telomere together with the DNA of interest. Usually there will also be one or

25 more markers present that allow for selection in the yeast host cells. For yeast selection, of particular interest are markers which complement mutations of the yeast host, such as genes involved in the production of amino acids, purines or pyrimidines, URA3, TRP1, LYS2, ADE2 on the YAC

30 to complement ura3, trp1, lys2 and Ade2 mutations in the host. By providing for complementation, for the most part only yeast cells carrying the entire YAC will be able to survive in a selective medium. In addition to genetic verification that both YAC arms have been retained, it

35 is desirable to confirm the integrity of the YAC using a method such as pulsed-field gel electrophoresis.



Those yeast hosts carrying the YAC may then be used as a source of the YAC for introduction into the ES cell. Transfer of the YAC is efficiently achieved by preparing yeast spheroplasts in accordance with conventional ways. By degrading the outer wall, under mild conditions, in an isotonic medium, spheroplasts are produced in high yield. Exponentially growing ES cells are protease-treated, e.g. trypsinized, and combined with the spheroplasts. Conveniently, a pellet of yeast spheroplasts can be prepared and the ES cells are spun with the pellet and exposed to a fusogenic agent such as PEG for 1-2 minutes. The cells are then resuspended and incubated in appropriate serum-free medium. The cells are then plated onto feeder cells, followed by selection in accordance with the selective marker. For the HPRT gene, HAT medium may be employed for selection. Surviving fusion colonies are then, picked, expanded and analyzed. Analysis may be performed by restriction enzyme analysis, combined with Southern blotting or pulsed-field gel electrophoresis, or by the polymerase chain reaction (PCR), employing appropriate primers, at least one of which is complementary to the DNA insert, and probing with repetitive sequences present in the xenogeneic DNA, such as Alu, for detection of human DNA sequences. Ty, Y', rDNA, delta sequences are used to probe for for yeast sequences. Probes for YAC ends are used to confirm integrity of the YAC. Those cells that demonstrate the intact or substantially intact YAC DNA integrated into the host genome are then used in the next steps. In some clones, only a portion or little or none of the yeast DNA becomes integrated into the mouse genome. The integrated yeast DNA ranges from more than about 90% of the original yeast genome to less than about 10% .

In a preferred embodiment, efficient production of transgenic non-human hosts is provided using a process which integrates large, at least 100 kb, xenogeneic DNA fragments, in substantially intact form, into a host



embryonic stem (ES) cell or fertilized egg (zygote). The introduction of the xenogeneic DNA is efficiently achieved by fusion of the ES cell with yeast spheroplasts that contain YACs carrying the 100 kb DNA and a selectable marker, under conditions allowing for integration of the YAC DNA containing the marker into the ES cell genome, or by transfection of a purified YAC into ES cells. ES cells comprising the YAC integrated into the genome are then selected by means of the marker, which is functional in the ES cell. For example, the hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) gene may be used as a marker in HPRT deficient (HPRT-) ES cells. For producing animals from embryonic stem cells, after transformation, the cells may be plated onto a feeder layer in an appropriate medium, e.g. fetal bovine serum enhanced DMEM. The ES cell may have a single targeted locus (heterozygous), or may be manipulated by the process of homogenotization to have both loci targeted (homozygous). The process of homogenotization (formation of homozygotes) uses selective pressure to grow out those cells which have the gene targeting event on both chromosomes. Cells containing the two targeted alleles may be detected by employing a selective medium and after sufficient time for colonies to grow, colonies may be picked and analyzed for the occurrence of integration or homologous recombination. As described previously, the PCR may be used, with primers within or outside of the construct sequence, but at the target locus.

Those colonies which show homologous recombination may then be used for embryo manipulation and blastocyst injection. The selected ES cells are then introduced into embryos, by microinjection or other means, into the appropriate host. For example, murine blastocysts may be obtained from female animals by flushing the uterus 3.5 days after ovulation. The modified ES cells are then trypsinized and at least 1 and up to 15 cells may be injected into the blastocoel of the blastocyst. After



injection, at least 1 and no more than about 10 of the blastocysts are returned to each uterine horn of pseudo-pregnant females. The females proceed to term and the resulting chimeric animals can be analyzed for the presence of the YAC in their somatic cells. By "chimeric" is meant an animal that carries cells derived from more than one source, e.g. from the host and another animal. For example, in the present invention a chimeric murine animal contains a genetically engineered modification, particularly a human gene, in some of its cells, e.g. in cells that develop from the modified embryonic stem cells. The presence of the integrated YAC in chimeric hosts that are generated is then analyzed. The chimeric hosts are evaluated for germline transmission of the ES cell genome by mating, for example chimeric mice are mated with C57BL/6J mice. Chimeric hosts may be bred with non-chimeric hosts, either syngeneic or allogeneic, to screen for chimeras that carry the YAC in their germ cells. Offspring that are heterozygous for the genetic modification are then interbred to produce progeny that are homozygous for the modification, stably transmitting the functioning YAC construct to their progeny.

The method of the invention for introduction of large xenogeneic DNA segments into a non-human host, particularly a rodent and usually a murine animal, provides for stable integration of the DNA. Genes in the inserted DNA are found to be functional and the resulting chimeric hosts are able to provide for germline transmission of the integrated DNA. After breeding of the chimeric host, transgenic heterozygous hosts are produced and are mated to produce a homozygous animal that may be used for a wide variety of purposes, including production of products, such as binding proteins, for example immunoglobulins, for screening of various drugs, for gene therapy, for example to complement for recessive genetic disorders, to study various diseases, to study





the function and regulation of poorly mapped large DNA fragments.

The following examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

5

## EXPERIMENTAL

### EXAMPLE I

#### I. Inactivation of the mouse heavy chain J ( $J_H$ ) genes

##### 10 A. Construction of the targeting inactivation vector

A 6.4 kb EcoRI fragment, containing the mouse heavy chain J genes and flanking sequences, is cloned from a Balb/c mouse embryo genomic library using the probes described in Sakano *et al.* (1981), *Nature* 290:562-565. This fragment (mDJ) is inserted into EcoRI-digested pUC19 plasmid (pmDJ). A 2.9 Kb fragment, containing the 4 J genes, is deleted by XhoI-ScaI digestion (pmD $\delta$ JNeo, see Figure 1). An 1150 bp XhoI-BamHI fragment, containing a neomycin-resistance gene driven by the Herpes simplex virus thymidine kinase gene (HSV-tk) promoter and a polyoma enhancer is isolated from pMC1Neo (Thomas and Capecchi (1987), *Cell*, 51, 503-512). A synthetic adaptor is added onto this fragment to convert the BamHI end into a ScaI end and the resulting fragment is joined to the XhoI-ScaI pmD $\delta$ J to form the inactivation vector (pmD $\delta$ J.Neo) in which the 5' to 3' orientation of the neomycin and the heavy chain promoters is identical. This plasmid is linearized by NdeI digestion before transfection to ES cells. The sequences driving the homologous recombination event are 3 kb and 0.5 kb fragments, located 5' and 3' to the neomycin gene, respectively.

##### 35 B. Culturing, Electroporation and Selection of ES Cells

The ES cell line E14TG2a (Hooper *et al.* (1987), *Nature*, 326:292-295) is cultured on mitomycin treated primary embryonic fibroblast-feeder layers essentially



as described (Doetschman et al. (1985), J. Embryol. Exp. Morphol. 87:27-45). The embryonic fibroblasts are prepared from embryos from C57BL/6 females that are mated 14 to 17 days earlier with a male homozygous for a neomycin transgene (Gossler et al. (1986), PNAS 83:9065-9069). These cells are capable of growth in media containing G418. Electroporation conditions are described by (Boggs et al. (1986), Ex. Hematol. (NY) 149:988-994). ES cells are trypsinized, resuspended in culture media at a concentration of  $4 \times 10^7$ /ml and electroporated in the presence of the targeting DNA construct at a concentration of 12nM in the first experiment and 5nM DNA in the second. A voltage of 300 V with a capacitance of 150-250  $\mu$ F is found optimal with an electroporation cell of 5 mm length and 100 mm<sup>2</sup> cross-section.  $5 \times 10^6$  electroporated cells are plated onto mitomycin-treated fibroblasts in 100 mm dishes in the presence of Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) and 0.1 mM 2-mercaptoethanol. The media is replaced 24 hrs after electroporation with media containing 200  $\mu$ g/ml G418.

ES colonies resulting 10-14 days after electroporation are picked with drawn out capillary pipettes for analysis using PCR. Half of each picked colony is saved in 24-well plates already seeded with mitomycin-treated feeder cells. The other halves, combined in pools of 3-4, are transferred to Eppendorf tubes containing approximately 0.5 ml of PBS and analyzed for homologous recombination by PCR. Conditions for PCR reactions are essentially as described (Kim and Smithies (1988), Nucleic Acids Res. 16:8887-8893). After pelleting, the ES cells are resuspended in 5  $\mu$ l of PBS and are lysed by the addition of 55  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O to each tube. DNases are inactivated by heating each tube at 95°C for 10 min. After treatment with proteinase K at 55°C for 30 min, 30  $\mu$ l of each lysate is transferred to a tube containing 20  $\mu$ l of a reaction mixture including PCR



buffer: 1.5  $\mu$ g of each primer, 3U of Taq polymerase, 10% DMSO, and dNTPs, each at 0.2 mM. The PCR expansion employs 55 cycles using a thermocycler with 65 seconds melt at 92°C and a 10 min annealing and extension time at 65°C. The two priming oligonucleotides are TGGCGGACCGCTATCCCCCAGGAC and TAGCCTGGGTCCCTCCTTAC, which correspond respectively to a region 650 bases 3' of the start codon of the neomycin gene and sequences located in the mouse heavy chain gene, 1100 bases 3' of the insertion site. 20  $\mu$ l of the reaction mix is electrophoresed on agarose gels and transferred to nylon membranes (Zeta Bind). Filters are probed with a <sup>32</sup>P-labelled fragment of the 991 bp XbaI fragment of the J-C region.

## EXAMPLE II

### II. Deletion of the mouse Ig heavy chain J (J<sub>H</sub>) genes in ES cells

#### A. Construction of the replacement targeting vector

A 6.1-Kb EcoRI fragment, containing the mouse immunoglobulin heavy chain J region genes and flanking sequences, cloned from a BALB/c mouse embryo genomic library and inserted into pUC18 (pJ<sub>H</sub>), was digested with XhoI and NaeI to delete an about 2.3 kb fragment containing the four J genes (see Figure 2A). An about 1.1 kb XhoI-BamHI fragment, blunted at the BamHI site, containing a neomycin resistance gene driven by the Herpes simplex virus thymidine kinase gene (HSV-tk) promoter and polyoma enhancer was isolated from pMC1Neo (Thomas and Capecchi (1987), Cell, 51, 503-512). This fragment was inserted into the XhoI-NaeI deleted pJH to form the deletion vector (pmH $\delta$ J, see Figure 2B), in which the transcriptional orientation of the neomycin and the heavy chain genes is the same. This plasmid was linearized by NdeI digestion before transfection to ES cells. The sequences driving the homologous recombination event are



about 2.8 kb and about 1.1 kb fragments, located 5' and 3' to the neomycin gene, respectively.

B. Culturing, Electroporation, and Selection of ES cells

5           The ES cell line E14TG2a (Koller and Smithies (1989),  
PNAS USA, 86:8932-8935) was cultured on mitomycin C-  
treated embryonic fibroblast feeder layers as described  
(Koller and Smithies (1989), PNAS USA, 86:8932-8935).  
ES cells were trypsinized, resuspended in HBS buffer (pH  
10       7.05; 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
21 mM HEPES pH 7.1) at a concentration of 2x10<sup>7</sup>/ml and  
electroporated in the presence of 50 µg/ml of the  
linearized inactivation vector. Electroporation was  
carried out with a BioRad Gene Pulser using 240 volts and  
15       500 µF capacitance. 5x10<sup>6</sup> electroporated cells were plated  
onto mitomycin C-treated fibroblasts in 100 mm dishes in  
the presence of Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)  
supplemented with 15% fetal bovine serum and 0.1 mM 2-  
mercaptoethanol. The media was replaced 24 hr after  
20       electroporation with media containing 200 µg/ml G418.  
G418-resistant ES colonies resulting from growth 12-14  
days after electroporation were picked with drawn out  
capillary pipettes for analysis using the polymerase chain  
reaction (PCR). Half of each picked colony was  
25       transferred to an individual well of a 24-well plate,  
already seeded with mitomycin C-treated feeder cells.  
The other halves, combined in pools of four, were  
transferred to Eppendorf tubes containing 0.3 ml of PBS  
and cell lysates were prepared for PCR analysis as  
30       described by Joyner et al (1989) Nature, 338:153-155.  
The PCR reaction included 5-20 µl of the cell lysate, 1  
µM of each primer, 1.5 U of Taq polymerase and 200 µM of  
dNTPs. The PCR amplification employed 45 cycles using  
a thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus), with 1 min. melt  
35       at 94°C, 2 min. annealing at 55°C, and 3 min. extension  
at 72°C. The two priming oligonucleotides are  
ACGGTATCGCCGCTCCCGAT and AGTCACTGTAAAGACTTCGGGTA, which





correspond respectively to about 120 bases 5' of the BamHI site of the neomycin gene, and to the sequences located in the mouse heavy chain gene, about 160 bases 3' of the insertion site. Successful homologous recombination gives rise to an about 1.4 kb fragment. 20  $\mu$ l of the reaction mixture is electrophoresed on 1% agarose gels, stained with ethidium bromide and transferred to nylon membranes (Gene Screen). Filters were probed with a  $^{32}$ P-labelled EcoRI-PstI about 1.4 kb fragment located in the mouse heavy chain, 3' of the insertion site (see Figure 2). For further analysis, genomic DNA was prepared from ES cells, digested with restriction enzymes as recommended by the manufacturers, and fragment were separated on 1% agarose gels. DNA was transferred to nylon membranes (Gene Screen) and probed with the  $^{32}$ P-labelled fragment as described above.

#### C. Analysis of G418-resistant ES colonies

In the first experiment, PCR analysis of the pooled colonies detected one positive PCR signal of the expected size (about 1.4 kb) out of 34 pools representing 136 G418-resistant colonies. The four individual colonies that had contributed to this positive pool were analyzed individually by PCR, and a positive clone, ES33D5, was identified. Similar analysis of 540 G418-resistant colonies obtained in the second experiment yielded 4 additional positive clones (ES41-1, ES61-1, ES65-1, ES110-1).

In order to verify the targeted disruption of one copy of the J genes, (the gene is autosomal and thus present in two copies), the PCR positive clones were expanded and genomic DNA was prepared, digested with HindIII or with SacI and analyzed by Southern analysis as described using the EcoRI-PstI probe.

The replacement of the J genes by insertion of the neomycin gene by an homologous recombination event results in a HindIII fragment, detectable with the EcoRI-PstI



probe, which is about 1.9 kb longer than the equivalent fragment in the native locus, due to the loss of two HindIII sites located in the deleted J gene region (see Figure 2C). Southern analysis of each of the 5 positive clones by HindIII digestion gave a pattern which indicated that one of the two copies of the heavy chain J genes had been disrupted. Three labelled fragments were detected: one fragment (about 760 bp), identical in size to that present in untreated cells at the same intensity, one fragment (about 2.3 kb) identical in size to that present in untreated cells, but of decreased intensity in the PCR positive clone, and an additional fragment about 4.2 kb, the size predicted for an homologous recombination event, present only in the PCR-positive clones. Similarly, the replacement of the J genes by the neomycin gene by an homologous recombination event results in a loss of one SacI site and the appearance of a fragment, detectable with the EcoRI-PstI probe, which is about 570 bp smaller than the equivalent fragment in the native locus (see Figure 2C). Southern analysis of the clones by SacI digestion gave the expected pattern of one native and one targeted allele: about 4.0 kb fragment, identical in size to that detected in untreated cells, but of decreased intensity in the 5 positive clones, and an additional fragment of about 3.4 kb, the size predicted for a targeted homologous recombination event, present only in the identified clones. Rehybridization of the Southern blots with a probe for the neomycin gene showed that only the 4.2 kb and 3.4 kb fragments, resulting from the HindIII and the SacI digestion, respectively, hybridized to the probe as predicted by the targeting event.

#### D. Generation of chimeric mice with J<sub>H</sub> deletions

Three and a half day old C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) blastocysts were obtained from 4-5 week old superovulated females as described by Koller, et al. 1989 (supra). ES cells were trypsinized,



washed once with fresh DMEM media, and diluted to about  $1 \times 10^6$ /ml in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum and 20 mM HEPES, pH 7.5. 10 to 15 cells were injected into the blastocoel of each blastocyst. ES-cell containing blastocysts were then surgically transferred to one uterine horn of C57BL/6J X DBA/2 or C57BL/6J X CBA F1 pseudopregnant females.

The contribution of ES cells to the offspring was judged visually by examination of the coat color of the pups. C57BL/6J mice are solid black in color. The ES cell parent line E14TG2a was isolated from 129/Ola embryos, which carry three coat color genes, the dominant  $A^W$  allele at the agouti locus, the recessive pink-eyes-dilute allele at the p locus, and the recessive  $C^{ch}$  at the c locus. Chimeric offspring in which the ES cells participated in the formation of the animal have coats containing agouti and cream hairs.

Germline transmission ability of the chimeric mice was evaluated by mating with a C57BL/6J mouse and scoring for F1 offspring with agouti color. 50% of these agouti mice would be expected to inherit the mutated heavy chain allele, which can be identified by Southern blot analysis of DNA isolated from tails.

The  $J_H$ -targeted ES cell line ES65-1, carrying one targeted heavy chain allele, was injected into C57BL/6J mouse blastocysts. About 45% of the surviving pups were chimeras. Two chimeric females, 238-2 and 244-3, upon mating with C57BL/6J males, yielded germline transmission at a frequency of 100% and 15%, as determined by the percent of agouti offspring. Southern blot analysis of DNA from heterozygous offspring indicated the presence of the targeted heavy chain in addition to one native allele in 2 out of 5 agouti progeny tested.

Mice homozygous for the mutation were obtained by intercrossing male and female mice which were identified as  $J_H$ -deleted ( $\delta J_H$ ) heterozygotes. Offspring of these



matings were analyzed for the presence of the two targeted heavy chain alleles by Southern blot analysis.

E. Analysis of B cells from chimeric mice

5           If deletion of the  $J_H$  region is sufficient to inactivate the heavy chain locus, then it should result in complete block of development of IgM-expressing B cells and of antibody production. Mice which are heterozygous at the  $J_H$  locus carry one intact and functional heavy chain allele, derived from the C57BL/6J parent, and one  $J_H$ -deleted heavy chain allele which is derived from the ES cells (129/Ola strain). The 129 and B6 strains differ in Ig heavy chain allotypes. The ES-derived B cells (IgM<sup>a</sup> allotype) can be distinguished from B6-derived B cells (IgM<sup>b</sup> allotype) with allotype-specific monoclonal antibodies, using flow cytometry analysis of antibody expressing B.

10           The specificity of these antibodies is shown in Figure 3 (A-C). Peripheral blood lymphocytes were stained with antibodies to the B cell specific marker, B220, and with antibodies to the IgM allotype. B cells from C57BL/6J mice stained with antibodies directed against the IgM<sup>b</sup> allotype but not the IgM<sup>a</sup> allotype (Figure 3B). B cells derived from 129/Ola mice stained with antibody against the IgM<sup>a</sup> allotype, but not the IgM<sup>b</sup> allotype (Figure 3A). In heterozygous (a/b F1) mice carrying one intact ES-derived heavy chain allele and one intact C57BL/6J-derived heavy chain allele, both allotypes were present in equal amounts (Figure 3C).

15           When B cells from mice which were heterozygous for the  $J_H$  deletion were analyzed, where the  $J_H$  deleted heavy chain allele was from the 129/Ola parent, there were no cells positive for the IgM<sup>a</sup> allotype. All B cells were IgM<sup>b</sup> positive, from the intact C57BL/6J heavy chain allele (Figure 3D). These results indicated that the  $J_H$ -deleted heavy chain locus is inactivated and cannot encode a functional IgM antibody.





Mice which were homozygous for the  $J_H$  deletion were also analyzed for the ability to produce functional antibodies. Peripheral blood lymphocytes from homozygous mutant mice were analyzed by flow cytometry, using  
5 antibodies to the B cell specific marker B220, and with the allotype specific markers (see Figure 4). In contrast to the control mice (Figure 4D-F), no B220<sup>+</sup> cells, or IgM producing cells could be detected in the mutant mice (Figure 4A-C). In addition, the mutant mice had no  
10 detectable IgM in the serum. These results indicate that the deletion of the  $J_H$  region from both heavy chain alleles leads to complete inhibition of B cell development to mature B cells and production of antibody.

15 F. Generation of homozygous mutant ES cells

The effect of  $J_H$  deletion on B cells can also be analyzed by generating ES cells with both heavy chain alleles targeted, which are then used to produce chimeric mice which contain a population of lymphoid cells  
20 homozygous for the mutation.

Homozygous  $\delta J_H$  mutant ES cells were generated by subjecting one of the heterozygous mutant ES clones, ES110-1, to elevated levels of G418 (1.4 mg/ml) thus selecting for homogenotization of the targeted allele.  
25 Seven of the surviving colonies were screened by Southern blot analysis using SacI digestion for the loss of the wild-type heavy chain allele and acquisition of a second targeted allele. One of these clones, ESDK207 was shown to have lost the native heavy chain allele, as evidenced  
30 by the inability of probes to detect the wild type 4.0 kb fragment and by the increased intensity of the 3.4 kb targeted fragment. Karyotypic analysis of ESDK207 indicated that, like the parent line ES110-1, about 80% of the cells had 40 chromosomes, suggesting that two  
35 targeted alleles were present. The homozygous mutant ES cells were microinjected into C57BL/6J blastocysts and chimeric mice were generated.



G. Analysis of B cells from homozygous chimeras

5 B cells from chimeric mice were analyzed to determine the effect of  $J_H$  deletion on B cell development and antibody production. Lymphocytes from the ES cell line (129/Ola) can be distinguished from blastocyst-derived (C57BL/6J) lymphocytes by a monoclonal antibody to the Ly-9.1 marker, which is found on lymphocytes of 129 origin, but not those of B6 origin. In addition, the two strains differ in their IgM allotype, as previously described.

10 The chimeras analyzed had been derived from wild-type E14TG2a ES cells (WT), or from ES cells that were heterozygous (ES110-1, ES65-1) or homozygous (ESDK207) at the targeted  $J_H$  region. Peripheral blood mononuclear cells were stained with antibodies to the B cell specific marker B220, and with antibodies to either Ly-9.1 or IgM allotypes, and then analyzed by two-color flow cytometry. To evaluate chimerism in the T cell lineage, the cells were stained with antibody for the T cell marker Thy 1.2, and with anti-Ly-9.1 antibody. Staining of cells from the parental mouse strains provided controls for the specificity and sensitivity of the assay.

20 Mice with similar degrees of chimerism, as judged by coat color, were compared. ES-derived B and T cells were detected in the peripheral blood of chimeric mice generated from the wild-type E14TG2a ES cells, confirming the ability of this cell line to give rise to lymphoid cells in vivo. Analysis of chimeras generated from single  $J_H$ -targeted ES65-1 and ES110-1 cells demonstrated the presence of  $B220^+/IgM^+/Ly-9.1^+$  B cells containing a single, intact, ES cell-derived Ig heavy chain locus.

30 In contrast to the WT and single deletion chimeras, mice generated from the homozygous mutant ESDK207 cell line lacked  $Ly-9.1^+/B220^+$  or  $IgM^+/B220^+$  B cells in peripheral blood. The observed lack of ESDK207-derived B cells was not due to a lack in lymphopoiesis, since ES-derived  $Ly-9.1^+/B220^-$  cells represented 12% of the total



pool of peripheral blood mononuclear cells. Of these, approximately half were Thy-1.2<sup>+</sup> T cells. Thus, deletion of the J<sub>H</sub> region from both alleles blocks development of mature IgM<sup>+</sup> producing B cells. Similar observations were made for chimeric spleen cells.

Chimeras were also tested for the presence of serum IgM derived from the ES cells. IgM<sup>+</sup> levels were high in chimeras from wild-type ES cells and cells with a single targeted mutation, but were undetectable in mice derived from the ESDK207 cell line.

Further analysis showed that the bone marrow of ESDK207 mice contained normal IgM<sup>b+</sup> B cells derived from the blastocyst host, but lacked ES-derived IgM<sup>a+</sup> B cells. However, DK207-derived bone marrow did contain a population of cells which were B220<sup>dim</sup>/Ly-9.1<sup>+</sup> derived from the ES cells. The bone marrow is therefore likely to contain a subpopulation of ES cell-derived B cell precursors, whose maturation is blocked by the homozygous deletion of the J<sub>H</sub> region.

The bone marrow cells were also analyzed with three-color flow cytometry, using antibodies to Ly-9.1, B220 and either CD43 or Thy-1.2. The results show the majority of ES-derived cells were CD43 positive, which is consistent with an early block in maturation. Many of the cells were also positive for Thy-1.2, as would be expected of very early B cell precursors. These data show that deleting the J<sub>H</sub> region results in the inability of the heavy chain locus to rearrange and produce functional IgM. Lack of IgH rearrangement results in a block of B cell maturation, restricting B cell progenitors to an early stage of development.



EXAMPLE IIIDeletion of the Mouse Ig kappa light chain constant  
(C<sub>k</sub>) region5     A. Construction of the replacement targeting vector

      The kappa region was inactivated with a replacement type vector, which was designed to delete the constant region of the kappa locus, and replace it with the G418 drug resistance marker through homologous recombination. Homologous recombination was driven by regions of homology which flank the constant region (see Figure 5).

      A genomic library from 129/Ola mouse fetal liver DNA (Stratagene) cloned into lambda phage was screened for the presence of the mouse C<sub>k</sub> gene with a 1.6 kb HpaI/BamHI fragment (Steinmetz and Zachau (1980) Nucleic Acids Research 8:1693-1706) that spans the mouse kappa constant region. A lambda phage clone which hybridized to this probe was identified, then purified and used as a source of C<sub>k</sub> DNA. Analysis of the phage DNA showed that the kappa constant region probe hybridized to a 5.6 kb SphI/BamHI fragment. This fragment contained the kappa J region genes, an intronic enhancer element and the kappa constant region. It was then isolated and subcloned into the SphI and BamHI sites of the plasmid pUC218 to give the plasmid pUC218/5.6kappa.

      In order to construct the deletion vector, fragments containing the 5' region of the kappa constant region, a thymidine kinase gene for negative selection, a neomycin resistance gene and a 3' region of homology to the kappa constant region were ligated together (see Figure 6).

      A 4.0 kb SphI/Bsu361 fragment from the plasmid pUC218/5.6kappa was subcloned into the SphI and Bsu361 sites of the vector pSK.A to give the plasmid pSK.A/5'K. The vector pSK.A is a modification of pBluescript SK- which has a synthetic polylinker:

5' GCATATGCCTGAGGTAAGCATGCCGTACCGAATTCTATAAGCTTGGCGCCGAGCT  
CATGCGTATACGGACTCCATTTCGTACGCCATGGCTTAAGATATTCGAACGCCGGCG 3'





inserted between the pBluescript KpnI and SacI sites.

A 2.7 kb EcoRI/HindIII fragment containing the herpes thymidine kinase (TK) gene driven by the mouse phosphoglycerate kinase gene (PGK) promoter from the plasmid pKJtk (Tybulewicz, et al. (1991) Cell 65:1153-1163) was inserted into the EcoRI and NotI sites of pSK.A/5'K by using a HindIII/NotI adapter with the sequence:

5' AGCTGGAACCCCTTGCCCTTGGGGAACGCCGG 3'.

In the resulting plasmid, pSK.A/5'K/TK, the 5' end of the TK gene and the kappa constant region gene are adjacent to each other, in opposite transcriptional orientations.

A 1.1 kb XhoI/BamHI fragment from pMC1Neo, which contains the mammalian drug selectable marker for resistance to neomycin, was cloned into the XhoI and BamHI sites of the plasmid pSK.B to give the plasmid pSK.B/Neo. The vector pSK.B is a modification of pBluescript SK- which has a synthetic polylinker:

5' GAGCTCGGATCCTATCTCGAGGAATTCTATAAGCTTCATATGTAGCT  
CATGCTCGAGCCTAGGATAGAGCTCCTTAAGATATTCGAAGTATACA 3'

inserted between the pBluescript KpnI and SacI sites.

A 1.1 kb BglII/BamHI fragment from pUC218/5.6kappa, which contains homology to the 3' end of the kappa region, was cloned into BamHI digested, alkaline phosphatase treated pSK.C vector. The vector pSK.C is a modification of pBluescript SK- which has a synthetic polylinker:

5' AAGCTTATAGAATTCGGTACCTGGATCCTGAGCTCATAGCGGCCGAGCT  
CATGTTTGAATATCTTAAGCCATGGACCTAGGACTCGAGTATCGCCGGCG 3'

inserted between the pBluescript KpnI and SacI sites.

The resulting plasmid, pSK.C/3'K is oriented such that transcription proceeds from the SacI site in the plasmid polylinker in the direction of the KpnI site.

The final targeting plasmid was constructed with a three part ligation, using (A) 6.1 kb NotI/NdeI fragment from pSK.A/5'K/TK, (B) 1.2 kb NdeI/SacI fragment from pSK.B/Neo and (C) 4.0 kb SacI/NotI fragment from pSK.C/3'K ligated to make the plasmid pK.TK/neo.



B. Electroporation of kappa deletion vector into ES cells

Purified plasmid DNA from pK.TK/Neo was cut with PvuI, extracted with phenol/chloroform and ethanol precipitated. The DNA was resuspended after precipitation at a concentration of 1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.

The embryonic stem cell line E14-1, a subclone of E14 (Hooper, et al. (1987) Nature 326:292-295) was cultured in DMEM 4.5 g/l glucose (J.R.H. Biosciences) supplemented with 15% heat inactivated fetal calf serum, recombinant murine leukemia inhibitory factor (ESGRO from Gibco BRL, 1000 U/ml), 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM glutamine and 100 U/ml penicillin at 37° C in 5% CO<sub>2</sub>.

The cells were cultured on mitomycin-treated primary embryonic fibroblast feeder layers essentially as described (Koller and Smithies (1989) supra). The embryonic fibroblasts were prepared from day 14 embryos carrying the homozygous targeted mutation of  $\beta$ 2-microglobulin (Koller and Smithies (1990) Science 248:1227-1230). These feeder cells are capable of growth in media containing G418.

At 80% confluency, the ES cells were prepared for electroporation by trypsinization, concentration by brief centrifugation and resuspension in HEPES-buffered saline at  $2 \times 10^7$  cells/ml. The cells are equilibrated at room temperature, and linearized targeting vector DNA (20  $\mu$ g) added. The mixture was electroporated at 960  $\mu$ F and 250 V with a BioRad Gene Pulser. The cells were left to stand at room temperature for 10 minutes before plating onto 4 x 10 cm dishes of mitomycin-treated fibroblast feeders ( $3 \times 10^6$  feeder cells/plate). After incubation at 37° C for 48 hours, the cells were fed media containing 150  $\mu$ g/ml G418 to select for neomycin resistance. After a further 48 hours the cells were fed media containing 150  $\mu$ g/ml G418 and 2  $\mu$ M gancyclovir (Syntex) to select for loss of the thymidine kinase gene.



### C. Analysis of targeted ES cells

After ten days of drug selection with both G418 and gancyclovir, the individual surviving colonies were picked and dissociated with a drop of trypsin in a 96 well plate, then incubated at 37° for 2 minutes. The cells from each colony were transferred into a well of a 24-well plate containing mitomycin C-treated feeder cells and selective media with G418, but not gancyclovir. After an additional 5-8 days, 20% of the cells in each well were frozen, and the remainder used to prepare genomic DNA. The cells were lysed with 0.4 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS and proteinase K (1 mg/ml) by overnight incubation at 50° C. The DNA was purified by phenol extraction and ethanol precipitation, then washed with 70% ethanol and resuspended in 20 µl of 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.

Southern analysis was carried out using BglII digested genomic DNA from each sample. An about 1.2 kb BamHI/BglII fragment which contains the region contiguous with the 3' homology fragment in the targeting vector was used as a probe. The native ES cell locus gave an about 2.3 kb fragment, while the targeted ES cell locus gave an about 5.7 kb fragment. The increase in size is due to the loss of a BglII site during the construction of the deletion vector.

A Southern analysis of 166 clones showed two cell lines which had the intended mutation. These clones were further analyzed by reprobng the filters with an about 1.1 kb fragment which spans the neo gene. As expected, the probe only hybridized to the targeted allele.

Further analysis of the genomic DNA from the two positive clones, 1L2-850 and 1L2-972, after being thawed and expanded, reconfirmed the initial observations. A third probe, an about 1.7 kb HindIII/BglII fragment spanning the kappa J region locus, was used to check for the correct integration pattern from the 5' end of the targeting vector. Using this probe with EcoRI digested



genomic DNA, an about 15 kb fragment is detected in the native allele, and an about 5 kb fragment from the targeted locus. The additional EcoRI site is introduced by the neo gene during homologous recombination targeting (see Figure 7).

#### D. Generation of germline chimeras

The unmodified E14-1 cells have been found to contribute to the germline at a high frequency after injection into C57BL/6J blastocysts. To generate germline chimeras containing the targeted kappa region, the targeted cell lines 1L2-850 and 1L2-972 were grown on primary feeder cells, then trypsinized and resuspended in injection medium, which consists of DMEM supplemented with 15% fetal calf serum, 20 mM HEPES (pH 7.3), antibiotics and  $\beta$ -mercaptoethanol. The ES cells were injected into each blastocyst, and the injected blastocysts then transferred to one uterine horn of a pseudopregnant female mouse. Chimeric pups were identified by chimeric coat color. Chimeric males were bred to C57BL/6J females, and germline transmission of the 129/Ola derived ES cells was detected by agouti coat color of the offspring.

One chimeric male from cell line 1L2-972 (about 40% ES cell derived as judged by its coat color), upon mating with C57BL/6J females yielded germline transmission at a frequency of 25% as determined by the percent of agouti offspring. Chimeric males, about 40%, 70% and 90% chimeric, from cell line 1L2-850 yielded germline transmission at a frequencies of 90%, 63% and 33%, respectively. Among the agouti offspring generated from the 70% chimeric male from 1L2-850, eight F1 animals out of 12 tested were found to be heterozygous at the kappa locus for the targeted  $C_k$  mutation by Southern analysis (a Bgl II digest using the 1.2 kb Bam HI/Bgl II fragment described above as a probe) using genomic DNA derived from tail samples. Further breeding of a male and female from





this group of 8 F1 animals, both heterozygous for the C<sub>κ</sub> mutation, yielded one male offspring found to be homozygous for this mutation as confirmed by Southern analysis.

5

E. Analysis of B cells obtained from mice targeted at the kappa locus

If the kappa (κ) light chain locus is inactivated because of deletion of the light chain constant region (C<sub>κ</sub>), the joining region(J<sub>κ</sub>), or both C<sub>κ</sub> and J<sub>κ</sub>, then a complete block in the development of κ-expressing B cells should result. Mouse embryonic stem cells containing a single copy of the complete C<sub>κ</sub> deletion (ΔC<sub>κ</sub>) were introduced into mouse blastocysts as described above to produce chimeric mice. These chimeric mice were then bred with wild-type C57BL/6 (B6) mice, and the F1 progeny were assayed for the presence of the ΔC<sub>κ</sub> mutation by Southern blotting of tail DNA. F1 mice that carried the ΔC<sub>κ</sub> mutation were bred and F2 offspring were assayed similarly for ΔC<sub>κ</sub>. One of 5 F2 offspring was shown to carry a homozygous C<sub>κ</sub> deletion, and another was heterozygous, bearing both ΔC<sub>κ</sub> and a wild-type C<sub>κ</sub> allele. The 3 other offspring were wild-type. The presence or absence of κ-positive B cells was assayed by flow cytometric analysis of peripheral blood B cells stained with fluorescent antibodies that react with a pan-B cell marker (B220) or with the κ light chain. For the homozygous ΔC<sub>κ</sub> F2 mouse no κ-positive B cells were detected, and in the heterozygote, there was a reduction in the frequency of κ positive B cells, consistent with the presence of a wild-type allele and a non-functional ΔC<sub>κ</sub> allele. These results demonstrate that deletion of C<sub>κ</sub> from the chromosome prevents κ expression by mouse B cells.

35

EXAMPLE IV



Inactivation of the mouse immunoglobulin kappa light chain  
J and constant region

5      A. Design of the targeting experiment

          The targeting vector was designed as a replacement  
type vector initially to delete the constant region as  
well as the J region of the kappa locus and replace it  
10      with three elements through homologous recombination using  
regions of homology flanking the constant region (Figure  
8). A diphtheria toxin gene (A chain) flanking either  
or both regions of homology was included in some cases  
as a negative selectable marker. The three elements  
15      consisted of the G418 resistance drug marker, an  
additional DNA homology (ADH) sequence of mouse DNA  
homologous to a region of the kappa locus located upstream  
of the J region, and a thymidine kinase gene. As a result  
of the inclusion of the ADH sequence in the vector, this  
20      initial targeting placed a second copy of the ADH in the  
locus. This duplication was then used to effect a defined  
deletion of the sequences between the segments by applying  
selective pressure. In this case the cell deletes the  
thymidine kinase gene that lies between the two segments  
25      in order to survive gancyclovir selection.

B. Construction of the targeting vector

          The regions of homology were derived from a 129 mouse  
fetal liver genomic library (Stratagene) which was  
30      screened using two probes, as described above in Example  
III. This subclone contained the J region, an intronic  
enhancer element and the constant region of the kappa  
light chain locus. The second probe was a 0.8 kb EcoRI  
fragment (Van Ness et al. (1981), Cell 27:593-602) that  
35      lies 2.8 kb upstream of the J region. Phage DNA from a  
lambda clone positive for this probe showed that the probe  
hybridized to a 5.5 kb SacI fragment which was subcloned  
into the SacI site of pBluescript SK (Stratagene) to give  
the plasmid pSK.5'kappa (Figure 8).



The inactivation vectors which contained a 5' region of homology, a thymidine kinase gene, a ADH, a neomycin resistance gene and a 3' region of homology (Figure 9) flanked in some instances by diphtheria toxin genes were constructed from three plasmids (Figure 8) containing:

5 (a) the 5' fragment of homology with or without the diphtheria toxin gene (DT) driven by the mouse phosphoglycerate kinase gene (PGK) promoter as a negative selectable marker, (b) the herpes thymidine kinase gene

10 (tk) driven by the mouse phosphoglycerate kinase gene (PGK) promoter as a negative selectable marker along with the DSH and the G418 selectable neomycin (neo) gene from pMC1Neo (Thomas and Capecchi (1987), Cell 51:503-12), and

15 (c) the 3' fragment of homology with or without the PGK driven DT gene. These three plasmids (Figure 8) were constructed from pSK.A, pSK.B, and pSK.C, respectively, all derived from the plasmid pBluescript SK by modification of the polylinker.

The polylinker of the plasmid pBluescript SK was modified by cloning between the KpnI and SacI sites a

20 synthetic polylinker defined by the oligonucleotides 5'-GCATATGCCTGAGGGTAAGCATGCGGTACCGAATTCTATAAGCTTGCGGCCGCAGCT-3' AND 5'-GCGGCCGCAAGCTTATAGAATTCGGTACCGCATGCTTACCTCAGGCATATGCGTAC-3' to create the plasmid

25 pSK.A, 5'-GAGCTCGGATCCTATCTCGAGGAATTCTATAAGCTTCATATGTAGCT-3' and 5'-ACATATGAAGCTTATAGAATTCCTCGAGATAGGATCCHAGCTCGTAC-3' to create plasmid pSK.B, 5'-AAGCTTATAGAATTCGGTACC TGGATCCTGAGCTCATAGCGGCCGCAGCT-3' to create plasmid pSK.B and 5'-GCGGCCGCTATGAGCTCAGGATCCAGGTACCGAATTCTATAAGCTTG TAC-3' to create the plasmid pSK.C.

30

A diphtheria toxin gene cassette was created in which the gene was flanked by the PGK promoter and the bovine growth hormone polyadenylation signal (Woychik et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3944-3948; Pfarr et al. (1986), DNA 5:115-122). A 2.3 kb XbaI/EcoRI fragment from pTH-1 (Maxwell et al. (1986), Cancer Res.

35



46:4660-4664) containing the diphtheria toxin A chain driven by the human metallothionein (hMTII) promoter was cloned into pBluescript SK<sup>-</sup> cut with XbaI and EcoRI to give the plasmid pSK.DT. The hMTII promoter of pSK.DT was replaced with the PGK promoter from pKJ1 (Tybulewicz et al. (1991), Cell 65:1153-1163). A 0.5 kb XbaI/PstI fragment from pKJ1 was joined to a 3.1 kb XbaI/NcoI fragment from pSK.DT using a PstI/NcoI adapter formed from the oligonucleotides 5'-GGGAAGCCGCCGC-3' and 5'-CATGGC GGCGGCTTCCCTGCA-3' to give the plasmid pSK.pgkDT. A 248 bp fragment containing the bovine growth hormone polyadenylation signal, obtained by PCR amplification of bovine genomic DNA using the oligonucleotide primers 5'-CAGGATCCAGCTGTGCCTTCTAGTTG-3' and 5'-CTGAGCTCTAGACCCATA GAGCCCACCGCA-3', was cloned into pCR1000 (Invitron Corp., San Diego, CA). The polyadenylation sequence was then cloned behind the DT gene as a HindIII/PvuII fragment into pSK.pgkDT cut with HindIII and HpaI to give the plasmid pSK.pgkDTbovGH. The DT gene cassette from pSK.pgkDTbovGH was moved as a 2.1 kb EcoRI/HindIII fragment into pSK.A cut with EcoRI and NotI using a HindIII/NotI adapter formed from the oligonucleotides 5'-AGCTGGAACCCCTTGC-3' and 5'-GGCCGCAAGGGGTTC-3' to give the plasmid pSK.A/DT. Between the SphI and Bsu36I sites of both pSK.A and pSK.A/DT the 5' region of homology for the kappa locus was cloned. For this purpose a 4.0 kb SphI/Bsu36I fragment resulting from a partial Bsu36I digest followed by a complete SphI digest of plasmid subclone pUC218/5.6kappa was ligated to pSK.A or pSK.A/DT to give the plasmids pSK.A/5'K and pSK.A/DT/5'K, respectively. In the plasmid, pSK.A/DT/5'K, the 5'-end of the DT gene and kappa fragment were adjacent to each other running in the opposite transcriptional orientations.

The PGKtk gene from the plasmid pKJtk (Tybulewicz et al. (1991), Cell 65:1153-1163) was cloned as a 2.7 kb EcoRI/HindIII between the unique EcoRI and HindIII sites of pSK.B to give pSK.B/TK. A 0.8 kb EcoRI fragment used





for the ADH was cloned from pSK.5'kappa and was ligated into the EcoRI site of pSK.B/TK to give pSK.B/(TK/0.8K) such that the 5'-end of the tk gene and kappa fragment were adjacent to each other running in opposite transcriptional orientations. The 1.1 kb neo gene from pMC1Neo was cloned as an XhoI/BamHI fragment between the same sites of pSK.B/(TK/0.8K) to give pSK.B/(TK/0.8K/Neo). The plasmid pSK.C/3'K containing the 3' fragment of homology was constructed by ligating pSK.C digested with BamHI and treated with alkaline phosphatase to the 1.1 kb BglIII/BamHI fragment isolated from pUC218/5.6kappa. In pSK.C/3'K, the kappa fragment was oriented such that transcription proceeded from the SacI in the plasmid polylinker in the direction of the KpnI site. The 2.1 kb DT cassette from pSK.pgkDTbovGH was cloned as an EcoRI/HindIII fragment into the same sites of pSK.C to give pSK.C/3'K/DT.

Three-part ligations were carried out to construct the final targeting plasmids (Figure 9). The 4.0 kb NotI/NdeI fragment from pSK.A/5'K, the 4.8 kb NdeI/SacI fragment from pSK.B/(TK/0.8K/Neo) (obtained by a SacI partial followed by and NdeI digestion of the plasmid), and the 4.0 kb SacI/NotI fragment from pSK.C/3'K were isolated and ligated together to create pK.(TK/0.8K/Neo). The 6.1 kb NotI/NdeI fragment from pSK.A/DT/5'K, the 4.8 kb NdeI/SacI fragment from pSK.B/(TK/0.8K/Neo), and 4.0 kb SacI/NotI fragment from pSK.C/3'K were isolated and ligated together to create pK.DT/(TK/0.8K/Neo). The 6.1 kb NotI/NdeI fragment from pSK.A/DT/5'K, the 4.8 kb NdeI/SacI fragment from pSK.B/(TK/0.8K/Neo), and 6.1 kb SacI/NotI fragment from pSK.C/3'K/DT (obtained by a SacI partial followed by a NotI digestion of the plasmid) were isolated and ligate together to create pK.DT/(TK/0.8K/Neo)/DT. For electroporation, the purified plasmid DNAs were first cut with PvuI or ApaI, then extracted with phenol/chloroform and precipitated by the addition of ethanol before centrifugation. The resultant



DNA pellets were resuspended at a concentration of 1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA(TE).

#### C. Introduction of DNA into cells

5           The embryonic stem cell line E14-1 was cultured as described above in Example III. The cells were equilibrated at room temperature, and DNA (20 µg) linearized with PvuI (as described above) was added. The mixture was electroporated as described above in Example  
10           III.

#### D. Analysis of constant region-targeted ES cells

          After 7-10 days under drug selection with G418, the individual surviving colonies were each picked and  
15           dissociated in a drop of trypsin as described above in Example III.

          Southern analysis was carried out using BgIII digested genomic DNA from each sample. A 2.3 kb fragment was detected from the native ES cell locus, while a larger  
20           4.9 kb fragment was detected from a targeted ES cell locus (Figure 11), using as a probe the 1.2 kb BamHI/BgIII fragment isolated from the original phage DNA contiguous with the fragment used for the 3' homology in the targeting vector. The fragment increased in size because  
25           the BgIII site in the BgIII/BamHI fragment was lost in the targeting plasmid due to the joining of a BgIII site to a BamHI site in the ligation, and a new BgIII site located in the thymidine kinase gene is introduced into the targeted locus.

30           From a screen by the Southern analysis described above, of a total of 103 clones derived from experiments using three different targeting plasmids, 5 cell lines were identified which carried the intended mutation (Table  
1).

35

Table 1  
C<sub>K</sub> Light Chain Targeting Result in E14-1



Construct	Number Screened by Southern	Number of Confirmed Targeted Clones	Clone Designation	Frequency of Targeting
pK.(TK/0.8K/Neo)	44	2	625,691	1/22
pK.DT(TK/0.8/Neo)	42	2	604,611	1/21
pK.DT(TK/0.8K/Neo)DT	17	1	653	1/17

5

10

15

20

Further analysis of genomic DNA produced from 4 of the positive clones (clones 625, 604, 611 and 653) after being thawed and expanded, re-confirmed the initial observations. Using a second probe, a 1.7 kb HindIII/BgIII fragment which spanned the J region of the kappa locus, the correct integration pattern was checked for homologous targeting at the 5' end of the targeting vector. Thus, using this probe with an EcoRI digest of the genomic DNA, a 15 kb fragment was detected from the unmodified allele. In contrast, a 7.8 kb fragment from the targeted allele was observed as a result of the introduction of a new EcoRI site in the thymidine kinase gene during the homologous integration (Figure 11).

#### E. In vitro excision of J region DNA from targeted clones

25

30

In order to effect the desired deletion from the homologously targeted kappa locus, cells from clone 653 were plated on feeder cells at a density of  $0.5-1 \times 10^6$  cells/10 cm dish in the presence of both gancyclovir (2  $\mu$ M) and G418 (150  $\mu$ g/ml). After growth for 5 days in the presence of both drugs, clones were picked as described above into 24-well plates and grown under G418 selection alone. After an additional 5-8 days, 20% of the cells in each well were frozen and the remainder used to prepare genomic DNA as previously described.

35

#### F. Analysis of J/constant region deleted ES cells

Southern analysis was carried out using BamHI digested genomic DNA from each sample. Using as a probe the 0.8



kb EcoRI fragment used as the ADH in the targeting vectors, as 12.7 kb fragment was detected from the native ES cell locus, while a larger 15.8 kb fragment was detected from the constant region-targeted ES cell locus (Figure 11) using DNA from clone 653. The fragment increased in size because of the insertion of the tk gene, the ADH, and the neo gene into the 12.7 kb BamHI fragment. There was also a new BamHI site introduced at the 3' end of the neo gene. Using DNA from the J/constant region deleted cells, a 5.5 kb fragment was detected from the modified locus in addition to the 12.7 kb fragment from the untargeted allele as predicted from analysis of the restriction map. From this screen by Southern analysis of 2 clones produced from  $1.5 \times 10^6$  ES cells plated (clone 653), one cell line (clone 653B) was identified which carried the intended deletion of the J and constant regions.

Further analysis of genomic DNA produced from clone 653B after being thawed and expanded re-confirmed the initial observations. Using the 0.8 kb EcoRI fragment, the deletion was checked with two other restriction digests which should cut outside of the excised region on the 5' and 3' ends of the targeting vector. Thus using this probe with a BgIII digest of the genomic DNA from the unexcised clone 653, a 2.6 kb fragment was detected from both the unmodified and modified alleles, whereas an additional 4.9 kb fragment was observed from the targeted allele only (Figure 11). This 4.9 kb fragment was the same as that detected with the 1.2 kb BamHI/BgIII fragment used previously. Using DNA from clone 653B, a BgIII digest revealed a 5.8 kb fragment in addition to the 2.6 kb fragment from the unmodified allele. A SacI digest of clone 653 DNA probed with the 0.8 kb EcoRI fragment showed a 5.5 kb fragment from both the unmodified and modified alleles and a 3.1 kb fragment from the targeted allele only (Figure 11). The 5.5 kb fragment was also detected in DNA from clone 653B and an additional





2.0 kb fragment. The 5.8 kb BgIII fragment and the 2.0 kb ScaI fragment were consistent with an analysis of the predicted restriction map for a precise excision step in which 10.3 kb of DNA were deleted including the J region, the tk gene, and one copy of the ADH.

#### G. Generation of Germline Chimeras

The unmodified E14-1 cells contributed to the germline at a high frequency after injection into C57BL/6J blastocysts. The cells from the targeted ES cell line 691, in which only the kappa constant region has been deleted by homologous recombination without any negative selection, were microinjected and chimeric animals were produced as described above in Example III. Cells from the targeted ES cell line 653B in which both the kappa constant and J regions were deleted are also microinjected and chimeric animals are produced as described above. Chimeric pups are identified by chimeric coat color. Germline transmission of the modified ES cell is detected by the agouti coat color of the F1 offspring.

#### EXAMPLE V

##### Cloning of Human Heavy Chain Locus using Yeast Artificial Chromosomes

##### A. Production of Yeast Artificial Chromosome (YAC) containing human heavy chain

An SpeI fragment, spanning the human heavy chain VH6-D-J-C $\mu$ -C $\delta$  region (Berman *et al.* (1988), *EMBO J.* 7: 727-738; see Figure 15) is isolated from a human YAC library (Burke, *et al.*, *Science*, 236: 806-812) using DNA probes described by Berman *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:727-738. One clone is obtained which is estimated to be about 100 kb. The isolated YAC clone is characterized by pulsed-field gel electrophoresis (Burke *et al.*, *supra*; Brownstein *et al.*, *Science*, 244: 1348-1351), using radiolabelled probes for the human heavy chain (Berman *et al.*, *supra*).



B. Introduction of YAC clones into embryos or ES Cells

High molecular weight DNA is prepared in agarose plugs from yeast cells containing the YAC of interest (i.e., a YAC containing the aforementioned SpeI fragment from the IgH locus). The DNA is size-fractionated on a CHEF gel apparatus and the YAC band is cut out of the low melting point agarose gel. The gel fragment is equilibrated with polyamines and then melted and treated with agarase to digest the agarose. The polyamine-coated DNA is then injected into the male pronucleus of fertilized mouse embryos which are then surgically introduced into the uterus of a pseudopregnant female as described above. The transgenic nature of the newborns is analyzed by a slot-blot of DNA isolated from tails and the production of human heavy chain is analyzed by obtaining a small amount of serum and testing it for the presence of Ig chains with rabbit anti-human antibodies.

As an alternative to microinjection, YAC DNA is transferred into murine ES cells by ES cell: yeast protoplast fusion (Traver et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:5898-5902; Pachnis et al., (1990), ibid 87: 5109-5113). First, the neomycin-resistance gene from pMC1Neo or HPRT or other mammalian selectable marker and a yeast selectable marker are inserted into nonessential YAC vector sequences in a plasmid. This construct is used to transform a yeast strain containing the IgH YAC, and pMC1Neo (or other selectable marker) is integrated into vector sequences of the IgH YAC by homologous recombination. The modified YAC is then transferred into an ES cell by protoplast fusion (Traver et al. (1989); Pachnis et al., 1990), and resulting G418-resistant ES cells (or exhibiting another selectable phenotype) which contain the intact human IgH sequences are used to generate chimeric mice. Alternatively, a purified YAC is transfected, for example by lipofection or calcium phosphate-mediated DNA transfer, into ES cells.



EXAMPLE VIIntroduction of Human Ig Genes into MiceA. Cloning of Human Ig Genes in Yeast

5     1. Identification and characterization of a human IgH  
YAC clone containing VH, D, JH, mu and delta sequences:

PCR primers for the human VH6 gene (V6A= 5' GCA GAG  
CCT GCT GAA TTC TGG CTG 3' and V6B= 5' GTA ATA CAC AGC  
CGT GTC CTG G 3') were used to screen DNA pools from the  
10     Washington University human YAC library (Washington  
University, St. Louis, MO). Positive pools were  
subsequently screened by colony hybridization and one  
positive microtiter plate well, A287-C10, was identified.  
Two different sized (205 kb and 215 kb) VH6-containing  
15     YACs were isolated from the microtiter well. In addition  
to VH6, the smaller of the two IgH YACs , A287-C10 (205  
kb), hybridized to probes for the following sequences:  
delta, mu, JH, D, VH1, VH2, and VH4. The larger of the  
two IgH YACs, A287-C10 (215 kb), hybridized to the  
20     following probes: delta, JH, D, VH1, VH2, and VH4, but  
not to mu. The YACs contained sequences from at least  
5 VH genes including two VH1 genes, one VH2, one VH4 and  
one VH6 gene. Analysis of restriction digests indicated  
that the 205 kb YAC contains a deletion (about 20 kb size)  
25     that removes some, but not all of the D gene cluster, with  
the remainder of the YAC appearing to be intact and in  
germline configuration. PCR and detailed restriction  
digest analysis of the 205 kb YAC demonstrated the  
presence of several different D gene family members. The  
30     215 kb YAC appeared to contain the complete major D gene  
cluster but had a deletion (about 10 kb) that removed the  
mu gene. This deletion does not appear to affect the JH  
cluster or the enhancer located between JH and mu genes.

The putative progenitor of the above two related IgH  
35     YACs, a YAC of about 225-230 kb containing the entire  
genomic region between the VH2 gene and the delta gene  
(Shin et al., 1991, supra) (see Figure 15), had not been



identified in the A287-C10 microtiter well. Hence, an earlier aliquot of the A287-C10 microtiter plate well was examined in order to search for the progenitor YAC under the assumption that it was lost during passaging of the library. The A287-C10 microtiter well was streaked out (Washington University, St. Louis, MO), and 2 of 10 clones analyzed contained a 230 kb IgH YAC with another apparently unrelated YAC. Clone 1 contained in addition the IgH YAC, an approximately 220 kb YAC and clone 3 in addition contained an approximately 400 kb YAC. The IgH YAC contained mu, the complete D profile (based on a BamHI digest, see below) and JH. The IgH YAC from clone 1 was physically separated from the unrelated YAC by meiotic segregation in a cross between A287-C10/AB1380 and YPH857 (genotype = MAT $\alpha$  ade2 lys2 ura3 trp1 HIS5 CAN1 his3 leu2 cyh2, to yield A287-C10 (230 kb)/MP 313 (host genotype = MAT $\alpha$  ade2 leu2 lys2 his3 ura3 trp1 can1 cyh2).

20 2. Targeting of the A287-C10 kb YAC with a mammalian selectable marker, HPRT:

25 A YAC right arm targeting vector called pLUTO (15.6 kb) was generated by subcloning a human HPRT minigene contained on a 6.1 kb BamHI fragment (Reid *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4299-4303 (1990)) into the BamHI site in the polylinker of pLUS (Hermanson *et al.*, Nucleic Acids Research 19:4943-4938 (1991)). A culture of A287-C10/AB1380 containing both the 230 kb IgH YAC and an unrelated YAC was transformed with linearized pLUTO and Lys<sup>+</sup> transformants were selected. The Lys<sup>+</sup> clones were screened by colony hybridization for the presence of mu. One clone was identified which contained a single YAC of approximately 245 kb which hybridized to probes for mu, HPRT and LYS2.

35 Southern analysis of the 230 kb A287-C10 YAC targeted with pLUTO was carried out using a variety of probes to demonstrate the intact, unrearranged nature of the cloned, human IgH sequences. In most cases, the results of BamHI,





HindIII and EcoRI digests were compared to restriction data for WI38 (a human embryonic fetal lung-derived cell line), the 205 kb and 215 kb deletion-derivatives of A287-C10 and to published values. The diversity (D) gene profile determined by hybridization with a D region probe (0.45 NcoI/PstI fragment; Berman et al., 1988) demonstrated the expected four D gene segments (D1-D4 (Siebenlist et al., 1981; Nature 294:631-635). For example, with BamHI, four restriction fragments, 3.8 kb, 4.5 kb, 6.9 kb and 7.8 kb, were observed in A287-C10 and WI38. WI38 had one additional larger band, presumed to originate from the chromosome 16 D5 region (Matsuda et al., 1988, EMBO 7:1047-1051). PCR and Southern analysis with D family-specific primers and probes demonstrated in the 215 kb deletion-derivative YAC (which appeared to have an intact D region with the same restriction pattern as the 230 kb YAC) the presence of 2 to 4 members of each of the following D gene families: DM, DN, DK, DA, DXP and DLR. The J-mu intronic enhancer, which was sequenced from cloned PCR products from the A287-C10 230 kb YAC (primers EnA = 5' TTC CGG CCC CGA TGC GGG ACT GC 3' and EnB1 = 5' CCT CTC CCT AAG ACT 3') and determined to be intact, also generated single restriction fragments of approximately the predicted sizes with BamHI, EcoRI and HindIII when probed with the 480 bp PCR product. The JH region was evaluated with an approximately 6 kb BamHI/HindIII fragment probe spanning DHQ52 and the entire JH region (Ravetch et al., 1981, Cell 27:583-591). A287-C10 generated restriction fragments of approximately the expected sizes. Furthermore, the same-sized restriction fragments were detected with the enhancer and the JH probes (Ravetch et al., supra; Shin et al., 1991, supra). The approximately 18 kb BamHI JH fragment detected in A287-C10 and WI38 also hybridized to a 0.9 kb mu probe sequence (Ravetch et al., supra). Hybridization with the 0.9 kb EcoRI fragment mu probe (Ravetch et al., supra) showed restriction fragments of approximately the expected



sizes (Ravetch et al., supra; Shin et al., supra): > 12 kb BamHI (approximately 17 kb expected); 0.9 kb EcoRI (0.9 kb expected) and approximately 12 kb HindIII (approximately 11 kb expected). WI38 gave the same-sized BamHI fragment as A287-C10. The JH and DHQ52 regions were sequenced from both of the deletion derivative YACs and both were in germline configuration. Delta was analyzed with an exon 1 PCR product (containing the approximately 160 bp region between primers D1B= 5' CAA AGG ATA ACA GCC CTG 3' and D1D = 5' AGC TGG CTG CTT GTC ATG 3'); restriction fragments for A287-C10 were close to those expected from the literature (Shin et al., supra) and to those determined for WI38. The 3' cloning site of the YAC may be the first EcoRI site 3' of delta (Shin et al., supra) or another EcoRI site further 3'. VH gene probes for VH1, VH4 and VH6 (Berman et al., supra), and for VH2 (Takahashi et al., 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81:5194-5198) were used to evaluate the variable gene content of the YAC. A287-C10 contains two VH1 genes that approximate the predicted sizes (Shin et al., supra; Matsuda et al., 1993, supra); restriction analysis with the three enzymes gave close to the expected fragment sizes; e.g. with EcoRI observed bands are 3.4 and 7.8 kb (expected are 3.4 and 7.2 kb). The predicted size EcoRI fragments for VH4 (5.3 kb observed, 5.1 kb expected) and for VH6 (0.8 kb observed, 0.9 kb expected) (Shin et al., supra; Matsuda et al., supra) were present in A287-C10. The expected size EcoRI fragment was seen for VH2 (5.5 kb observed, 5.4 kb expected), but the BamHI and HindIII fragments were different from those predicted. Coincident hybridization of the BamHI and HindIII fragments with a pBR322 probe suggested that the EcoRI site which is at the 5' end of the VH2 gene (Shin et al., supra) is the 5' cloning site, thus eliminating the natural 5' HindIII site and BamHI sites. The overall size of the YAC insert (estimated to be approximately 220 kb) fits well with the predicted size for an intact, unrearranged segment



starting at the 5' end of the 3'-most VH2 gene and extending to an EcoRI site 3' of the delta locus (Shin et al., supra).

5        3. Identification and characterization of IgK YACs containing CK and VK sequences:

Two YACs were identified in a screen of pulsed-field gel (PFG) pools from the Washington University (St. Louis, MO) human YAC library with a probe from the human kappa constant region (CK) gene (2.5 kb EcoRI fragment ATCC No. 59173, Parklawn Dr., Rockville, MD). The YACs, designated A80-C7 (170 kb) and A276-F2 (320 kb), contain the kappa deleting element kde, CK, JK and the C-J intronic enhancer and extend 3' beyond kde. Extending 5' from JK, the YACs also contain the B1, B2 and B3 VK genes determined by hybridization and/or PCR, and possibly other VK sequences. The A80-C7/AB1380 strain housed, in addition to the IgK YAC, an unrelated YAC of similar size. Therefore, meiotic segregation was used to separate these YACs; A80-C7 was crossed to YPH857 and a meiotic product was obtained which contained only the IgK YAC (MP8-2; host genotype =  $\alpha$  ade2 leu2 his3 his5 lys2 ura3 trp1 can1 cyh2). The A80-C7 and A276-F2 YACs have been targeted with pLUTO to incorporate the human HPRT minigene into the YAC right vector arm.

25        Restriction analysis of the IgK YACs A80-C7 and A276-F2 using a number of enzymes supports the conclusion that both YACs are unrearranged (i.e., in germline configuration). For example, BamHI digestion followed by hybridization with the CK probe demonstrates the expected 13 kb restriction fragment (Klobeck et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 370:1007-1012 (1989)). The same-sized band hybridizes to a JK probe (a 1.2 kb PCR product using primer set to amplify the JK1-5 region), as predicted from the genomic map (Klobeck et al., supra). The B3 class IV gene (probe is a 123 bp PCR product from the B3 gene) gives a 4.9 kb BamHI and a 2.2 kb BglII fragment, close to the published values of 4.6 kb and 2.3 kb, respectively



(Lorenz et al., Molec. Immunol. 25:479-484 (1988)). PCR analysis of both IgK YACs as well as human genomic DNA for the following kappa locus sequences revealed the predicted band sizes: Kde (120 bp), CK (304 bp), C-J intronic enhancer (455 bp), JK1-5 (1204 bp), B3 VK (123 bp) and B1 VK pseudogene (214 bp). Sequences used to design PCR primers for the CK, JK and C-J enhancer regions are from Whitehurst et al., Nucl. Acids. Res. 20:4929-4930 (1992); Kde is from Klobeck and Zachau, Nucl. Acids. Res. 14:4591-4603 (1986); B3 is from Klobeck et al., Nucl. Acids. Res. 13:6515-6529 (1985); and B1 is from Lorenz et al., supra.

#### B. Introduction of 680 kb yHPRT YAC into ES Cells

##### 1. Culture of yHPRT yeast strain and preparation of yeast spheroplasts

The 680 kb yHPRT is a YAC containing a functional copy of the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene cloned from a YAC library, as described in Huxley, et al. (1991) Genomics 9:742-750. The yeast strain containing the yHPRT was grown in uracil and tryptophan deficient liquid media, as described in Huxley, et al. (1991) supra.

To prepare the yeast spheroplasts, a 400 ml culture of yeast containing yHPRT was spun down and the yeast pellet was washed once with water and once with 1 M sorbitol. The yeast pellet was resuspended in SPEM (1 M sorbitol, 10 mM sodium phosphate pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8.0, 30 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) at a concentration of  $5 \times 10^8$  yeast cells/ml. Zymolase 20T was added at a concentration of 150  $\mu$ g/ml of yeast cells, and the culture was incubated at 30°C until 90% of the cells were spheroplasts (usually for 15-20 minutes). The cells were washed twice in STC (1 M sorbitol, 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) and resuspended in STC at a concentration of  $2.5 \times 10^8$ /ml.





## 2. Culture of E14TG2a ES Cells

HPRT-negative ES cell line E14TG2a was cultured as previously described.

## 5 3. Fusion of ES Cells and Yeast Spheroplasts

Exponentially growing E14TG2a ES cells growing on gelatin-coated dishes were trypsinized and washed three times with serum-free DMEM. A pellet of  $2.5 \times 10^8$  yeast spheroplasts was carefully overlaid with  $5 \times 10^6$  ES cells which were spun down onto the yeast pellet. The combined pellet was resuspended in 0.5 ml of either 50% polyethylene glycol (PEG) 1500 or 50% PEG 4000 (Boehringer Mannheim) containing 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . After 1.5 minutes incubation at room temperature or at  $37^\circ\text{C}$ , 5 ml of serum-free DMEM were added slowly, and the cells were left at room temperature for 30 minutes. The cells were then pelleted and resuspended in 10 ml of ES cell complete medium (as previously described) and were plated onto one 100 mm plate coated with feeder cells. After 24 hours the medium was replaced with fresh medium. Forty-eight hours post-fusion, HAT (ES media containing  $1 \times 10^{-4}$  M hypoxanthine,  $4 \times 10^{-7}$  M aminopterin,  $1.6 \times 10^{-5}$  thymidine) selection was imposed. HAT-resistant ES colonies were observed 7-10 days post-fusion in the plates from both the different fusion conditions used. yHPRT-ES ("ESY") fusion colonies were picked and plated onto feeder-coated wells, and expanded for further analysis.

## 30 4. Analysis of YAC DNA Integrated into yHPRT-ES Fusion Clones

DNA extracted from 23 yHPRT-ES fusion colonies was digested with HindIII and subjected to Southern blot analysis (Figure 12) using the probes: a human repetitive Alu sequence (A); pBR322-specific sequences for the right (B) and left (C) YAC vector arms; yeast Ty repetitive sequence (D); yeast single copy gene LYS2 (E). The human HPRT probe, a 1.6 kb full length cDNA (Jolly et al., Proc.



Natl. Acad. Sci. USA 80:477-481 (1983)) was used to confirm the presence of the human HPRT gene in ESY clones. The Alu probe was a 300 bp BamHI fragment from the BLUR8 Alu element in pBP63A (Pavan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1300-1304 (1990)). The right and left vector arm probes were pBR322-derived BamHI-PvuII 1.7 and 2.7 kb fragments, respectively, which correspond to the vector sequences in pYAC4 (scheme a, b (Burke et al., in: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Guthrie and Fink, eds., Academic Press, 194:251-270 (1991)). The 4.5 kb fragment, detected by the right arm probe, spans the region between the HindIII site at the telomere 5' end and the first HindIII site within the human insert (scheme a). The 3 kb and 4.1 kb fragments detected by the left end probe correspond to the region between the HindIII site at the telomere end and the HindIII site 5' of the yeast sequences, and the region spanning from the HindIII site 3' of the centromere into the human insert, respectively (scheme b). The difference in the hybridization intensity of these two bands relates to the difference in the amount of homology between these fragments and the probe. The yeast Ty repetitive probe (Philippsen et al., in Gene Expression in Yeast, Proceedings of the Alko Yeast Symposium, Helsinki, Korhola and Vaisanen, eds., Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, 1:189-200 (1983)) was a 5.6 kb XhoI fragment isolated from Ty1-containing pJEF742 which could also detect the 3' HindIII fragment of Ty2, due to the homology between the two elements. The LYS2 gene probe was a 1.7 BamHI fragment from pLUS (Hermanson et al., Nuc. Acids. Res. 19:4943-4948 (1991)).

Hybridization with a human HPRT probe (full length 1.6 kb cDNA probe) demonstrated that all the clones analyzed contained the same 15, 7 and 5 kb exon-containing fragments of the human HPRT gene as the yHPRT YAC. Reprobing the same blots with a human repetitive Alu



sequence 300 bp probe indicated that all the clones analyzed contained most, if not all, the Alu-containing fragments present in yHPRT (Figure 12A). These data indicate that in most of the clones analyzed the 680 kb human insert had not been detectably rearranged or deleted upon integration into the ES cell genome. Integration of YAC vector sequences was examined using probes specific for the vector arms. Rehybridization of the same blots with a probe for the right YAC vector arm, detecting a 4.5 kb HindIII fragment, indicated that in 10 out of 23 of the clones analyzed, the right YAC arm up to the telomere was still intact and unrearranged and linked to the human insert (Figure 12B) thus providing further evidence for the integrity of the YAC in these clones. The left arm probe detected the 3 kb and 4.1 kb HindIII yHPRT fragments in 18 out of the 20 clones analyzed (Figure 12C), indicating a high frequency of left arm retention.

The structural integrity of yHPRT in ESY clones was further evaluated for two clones (ESY 5-2 and 8-7) using pulsed-field gel restriction analysis. In yeast carrying yHPRT, five Sfi fragments of the following approximate sizes were defined by different probes: 315 kb (Alu, left arm), 145 kb (Alu, HPRT); 95 kb (Alu, right arm), 70 and 50 kb (Alu only). In both ES clones, the internal HPRT and Alu-specific fragments were similar in size to the yHPRT fragments. The end fragments detected for both clones were larger than those in yHPRT, as expected for YACs integrated within a mouse chromosome: 185 and 200 kb for the right end fragment, respectively, and over 800 kb for the left end fragment for both clones. These data, together with the Alu profile, provide additional evidence for the retention of the structural integrity of the YAC in these clones. These studies were complemented by fluorescence in-situ hybridization carried out on ESY 8-7 (Figure 13 A, B) and ESY 8-6 metaphase chromosome spreads in which a single integration site was detected for the



human sequences. Photomicrographs of representative metaphase spreads (Figure 13 A, B, C) or interphase nuclei (Figure 13D) from ESY 8-7 cells (Figure 13 A, B) hybridized with biotinylated human genomic sequences and ESY 8-6 cells (Figure 13 C, D) hybridized with biotinylated yeast repeated DNA sequences. The human probe was generated from human genomic placental DNA (Clontech, Palo Alto, CA). The yeast probe consisted of a mix of DNA fragments encoding the yeast repeated elements; delta (a 1.08 kb Sau3A fragment of pdelta6 (Gafner et al., EMBO J. 2:583-591 (1983)) and Ty (a 1.35 kb EcoRI-SaII fragment of p29 (Hermanson et al., Nuc. Acids. Res. 19:4943-4948 (1991)), the rDNAs (a 4.6 kb BgIIIk-A L90 and a 4.4 kb BgIII-B L92 fragment (Keil and Roeder, Cell 39:377-386 (1984)), and the Y' telomere elements (2.0 and 1.5 kb BgIII-HindIII fragments of p198 (Chan and Tye, Cell 33:563-573 (1983)). Hybridization of sequences on chromosome metaphase spreads with biotinylated probes and detection by Avidin-FITC followed by biotin-anti-Avidin and Avidin-FITC amplification was carried as described by Trask and Pinkel, Methods Cell Biol. 30:383-400 (1990), using a Zeiss Axiophot microscope. Chromosomes were counterstained with propidium iodide. The photomicrographs shown are representative of 95% of the metaphase spreads or interphase nuclei scanned in three independent experiments carried out with the human or the yeast probes. A single integration site was detected for the human sequences.

The same blots were also probed with the yeast Ty repetitive element sequence to detect the presence of yeast genomic DNA sequences in the ESY clones (Figure 12 D). Whereas some of the clones were found to contain most of the Ty-containing fragments present in the parental yeast strain, some of the clones were found to have a very small fraction, if at all, of the Ty-containing fragments. These results indicate that in some ES clones, although the YAC DNA is integrated intact, little or no yeast





genomic DNA was integrated. To determine if the yeast chromosomal DNA was integrated at single or multiple sites within the ES cell genome, fluorescent in-situ hybridization was performed on ESY clone 8-6 which had a complete Ty profile. A single integration site was detected using a combined yeast repetitive probe (Figure 13 C, D), indicating that within the limits of resolution, all yeast DNA fragments integrated in one block.

Using the ability of ES cells to undergo in vitro orderly differentiation, YAC stability and the effect of integrated DNA on the pluripotency of ES cells was investigated. Four ES clones, containing different amounts of yeast DNA (ESY 5-2, 3-6, 8-6 and 8-7) exhibited a differentiation pattern indistinguishable from that of unfused ES cells: formation of embryoid bodies giving rise to a variety of differentiated cell types (Figure 14 A). Southern blot analysis was performed on DNA extracted from differentiated ESY 5-2, 3-6, 8-5 and 8-6 (20  $\mu$ g) and yHPRT in AB1380 (40 ng) using (a) a human Alu probe; (b) yeast Ty sequences. ES clones were induced to form embryoid bodies by culturing them as aggregates in suspension for 10-14 days as described by Martin and Evans, Cell 6:467-474 (1975). Following their reattachment to tissue culture substratum, ESY-derived embryoid bodies gave rise to differentiated cell types. YAC and yeast DNA sequences were stably retained by the differentiated ES clones during 40 days of culture in non-selective medium, demonstrating that the stably integrated foreign DNA did not impair the pluripotency of the ES cells (Figure 14 B). The differentiated cultures maintained a functional human HPRT gene as evidenced by their normal growth and differentiation when transferred to HAT-selective medium.

#### 5. Generation of chimeric mice from yHPRT-ES cell lines

The ability of ESY cells to repopulate mice, including the germline, was demonstrated by microinjection of ES cells into mouse blastocysts and the generation of



chimeric mice. ESY cells were microinjected into C57BL/6J mouse blastocysts, and chimeric mice were generated as previously described. Chimeric males were mated with C57BL/6J females and germline transmission was determined by the presence of agouti offspring. Genomic DNA prepared from the tails of the chimeric mice were analyzed for the presence of the yHPRT DNA in the mouse genome by PCR analysis. The presence of the YAC left arm was analyzed using the two priming oligonucleotides, 5' TTCTCGGAGCACTGTC CGACC and 5' CTTGCGCCTTAAACCAACTTGGTACCG, which were derived, respectively, from the pBR322 sequences and the SUP4 gene within the YAC left vector arm. A 259 bp PCR product was obtained from the analysis of the yeast containing yHPRT and the ESY cell lines. PCR analysis of tail DNA prepared from 18 chimeric mice generated from ESY cell lines ESY3-1 ESY3-6 and ESY5-2, gave rise to the expected PCR product, thus indicating the presence of the YAC left vector arm in the genome of the chimeric mice.

#### 6. Germline transmission of yHPRT

Chimeric males, with coat color chimerism of 30-60%, derived from the ESY cell lines ESY3-1 and ESY5-2 were set up for mating for germline transmission evaluation, i.e. to determine whether the genetic modification was passed via the germ cells (sperm or oocytes) to the progeny of the animals. Three of the chimeric ESY3-1 derived males, 394/95-1, 394/95-2 and 411-1 transmitted the ES cell genome to their offspring at a frequency of 20%, 30% and 30%, respectively. Southern blot analysis of tail DNA from the agouti pups indicated the presence of the yHPRT in the genome of three mice, 4-2, 4-3 and 5-1, derived from the 394/395-2 chimera. The Alu profile obtained from such analysis was indistinguishable from that of the parent ES3-1 cell line (Figure 14 C), demonstrating that the 680 kb human insert was transmitted faithfully through the mouse germline.



Using a human HPRT-specific PCR assay on mRNA-derived cDNAs from a yHPRT-containing offspring, the expression of the human HPRT gene in all the tissues tested was detected (Figure 15 A and B), thus demonstrating the transmitted YAC retained its function with fidelity. In this experiment, human HPRT mRNA was detected by reverse transcription (RT)-PCR in ES, ESY 3-1 and Hut 78 (human) cells, spleen and liver from a control mouse (C) or the 4-3 agouti offspring (derived from the 394/95-2 chimera) and a sample containing no template DNA (indicated as "-" in Figure 15A). Reverse transcription of poly (A+) RNA and PCR amplification of specific cDNA sequences were performed using the cDNA Cycle Kit (Invitrogen). Specific amplification of a 626 bp fragment from human HPRT cDNA in the presence of murine HPRT cDNA was performed as outlined by Huxley et al, supra. Integrity of all RNA samples was demonstrated by PCR amplification of cDNAs for the mouse  $\gamma$ -interferon receptor. The primers used to amplify a 359 bp fragment were: GTATGTGGAGCATAACCGGAG and CAGGTTTTGTCTCTAACGTGG. The human HPRT and the  $\gamma$ -interferon receptor primers were designed to eliminate the possibility of obtaining PCR products from genomic DNA contamination. PCR products were analyzed by electrophoresis and visualized with ethidium bromide. The size markers are 1 kb ladder (BRL). The results of detection of mouse  $\gamma$ -interferon receptor mRNA by RT-PCR in the samples described above are shown in Figure 15B. The specific human HPRT mRNA was also detected in the other tissues tested (brain, kidney and heart) derived from the 4-3 mouse. Comparable steady-state levels of mouse and human HPRT mRNA were detected in the liver of yHPRT-containing progeny. These results indicate that the uptake of as much as 13 megabases of yeast genomic DNA was not detrimental to proper development, germline transmission or gene expression.

The above results demonstrate that yeast spheroplasts are an effective vehicle for the delivery of a single copy



large molecular weight DNA fragment into ES cells and that such molecules are stably and functionally transmitted through the mouse germline. The Alu profiles, complemented by PFGE analysis and in situ hybridization for some of the ES clones, strongly argue that the majority of the clones contained virtually all the human insert in unarranged form (i.e. in "germline configuration"), with a high frequency of clones (40%) also retaining both YAC arms. The significant uptake of yeast genomic DNA was not detrimental to proper differentiation of ES cells in vitro and in vivo and did not prevent germline transmission or gene expression. By these methods, one can transmit large fragments of genomic DNA as inserts into non-human animal genomes, where the inserts may be transmitted intact by germline transmission. Therefore, a wide variety of xenogeneic DNA can be introduced into non-human hosts such as mammals, particularly small laboratory animals, that may impart novel phenotypes or novel genotypes. For example, one can provide in small laboratory animals genes of a mammal, such as a human, to study the etiology of a disease, the response to human genes to a wide variety of agents. Alternatively, one can introduce large loci into a mammalian host to produce products of other species, for example humans, to provide human protein sequences of proteins such as immunoglobulins, T-cell receptors, major histocompatibility complex antigens, etc.

Introduction of heavy chain YAC A287-C10 and kappa chain YAC A80-C into ES cells and Embryos

Yeast containing the human heavy chain YAC A287-C10 targeted with pLUTO (yA287-C10) were spheroplasted and fused with the HPRT-deficient ES cell line E14.1TG3B1 as described above. Ten HAT-resistant ES (ESY) clones (2B, 2C, 2D, 3A, 3B, 5C, 1125A, 1125E, 100/1500 and 100/4000) were picked and were expanded for DNA analysis.





Evaluation of the integrated YAC was performed by Southern blot analysis of HindIII-digested DNA from these clones, using human heavy chain probes for the D, J<sub>H</sub>,  $\mu$ , and VH2 regions, described above. All ESY clones were found to contain the expected > 10 kb J<sub>H</sub> and  $\mu$  fragments. All ESY clones except 2D and 5C clones, were found to contain the 4.8 kb VH2 kb fragment. All ESY clones, except 2D and 3B were found to contain the expected 10 and 7.6 kb D gene fragments. Yeast genomic sequences were detected by hybridization to the yeast repetitive Ty element in all ESY clones except 2B, 2D, 100/1500 and 5C. ESY clones 2B, 3A and 5C were microinjected into C57B/6 blastocysts as described above and chimeric mice (10 from 2B clone, 1 from 3A clone and 1 from 5C clone) were generated. Southern blot analysis of tail DNA from 10 of these chimeric animals, indicated the presence of most, if not all, of the apparent 10 Alu fragments, detected in yA287-C10 in yeast, as well as the presence of VH<sub>2</sub> and D gene fragments. The generated chimeric mice were bred with C57BL16J mice for germline transmission evaluation. A chimeric male 78K-3 derived from the 2B clone transmitted the ES cell genome to its offspring at a frequency of 100%. Southern blot analysis of tail DNA from 4 out of 6 agouti mice pups indicated the presence of human heavy chain sequences.

Fusion experiments with yeast containing the human kappa chain YAC A80-C7 targeted with pLUTO (yA80-C7) with E14.1TG3B1 ES cells generated 2 HAT-resistant ESY clones: M4.4.1 and M5.2.1. Southern blot analysis of HindIII-digested DNAs from these clones revealed the presence of all the apparent 10 Alu fragments detected in yA80-C7 in yeast. In both clones yeast genomic sequences were integrated. ESY clones were microinjected into C57B1/6J blastocysts and chimeric mice were generated.

#### EXAMPLE VII



Production of human Ig by chimeric mice by Introduction  
of Human Ig using Homologous Recombination

5 As an alternative approach to that set forth in  
Examples I-VI, human Ig genes are introduced into the  
mouse Ig locus by replacing mouse heavy and light chain  
immunoglobulin loci directly with fragments of the human  
heavy and light chain loci using homologous recombination.  
This is followed by the generation of chimeric transgenic  
animals in which the embryonic stem-cell derived cells  
10 contribute to the germ line.

A. Construction of human heavy chain replacement vector.

The replacing human sequences include the SpeI 100  
kb fragment of genomic DNA which encompasses the human  
15 VH6-D-J-C $\mu$ -C $\delta$  heavy chain region isolated from a human-YAC  
library as described before. The flanking mouse heavy  
chain sequences, which drive the homologous recombination  
replacement event, contain a 10 kb BamHI fragment of the  
mouse C $\epsilon$ -C $\alpha$  heavy chain and a 5' J558 fragment comprising  
20 the 5' half of the J558 fragment of the mouse heavy chain  
variable region, at the 3' and 5' ends of the human  
sequences, respectively (Figure 16). These mouse  
sequences are isolated from a mouse embryo genomic library  
using the probes described in Tucker *et al.* (1981), *PNAS*  
25 *USA*, 78: 7684-7688 and Blankenstein and Krawinkel (1987,  
*supra*), respectively. The 1150 bp XhoI to BamHI fragment,  
containing a neomycin-resistance gene driven by the Herpes  
simplex virus thymidine kinase gene (HSV-tk) promoter and  
a polyoma enhancer is isolated from pMC1Neo (Koller and  
30 Smithies, 1989, *supra*). A synthetic adaptor is added onto  
this fragment to convert the XhoI end into a BamHI end  
and the resulting fragment is joined to the BamHI mouse  
C $\epsilon$ -C $\alpha$  in a plasmid.

From the YAC clone containing the human heavy chain  
35 locus, DNA sequences from each end of the insert are  
recovered either by inverse PCR (Silverman *et al.* (1989),  
*PNAS*, 86:7485-7489), or by plasmid rescue in *E. coli*,



(Burke et al., (1987); Garza et al. (1989) Science, 246:641-646; Traver et al., 1989) (see Figure 8). The isolated human sequence from the 5'V6 end of the YAC is ligated to the mouse J558 sequence in a plasmid and likewise, the human sequence derived from the 3'Cd end of the YAC is ligated to the Neo gene in the plasmid containing Neo and mouse C $\epsilon$ -C $\alpha$  described above. The human V6-mouse J558 segment is now subcloned into a half-YAC cloning vector that includes a yeast selectable marker (HIS3) not present in the original IgH YAC, a centromere (CEN) and a single telomere (TEL). The human C $\delta$ -Neo-mouse C $\epsilon$ -C $\alpha$  is likewise subcloned into a separate half-YAC vector with a different yeast selectable marker (LEU2) and a single TEL. The half-YAC vector containing the human V6 DNA is linearized and used to transform a yeast strain that is deleted for the chromosomal HIS3 and LEU2 loci and which carries the IgH YAC. Selection for histidine-prototrophy gives rise to yeast colonies that have undergone homologous recombination between the human V6 DNA sequences and contain a recombinant YAC. The half-YAC vector containing the human C $\delta$  DNA is then linearized and used to transform the yeast strain generated in the previous step. Selection for leucine-prototrophy results in a yeast strain containing the complete IgH replacement YAC (see Figure 16). Preferably, both targeting events are performed in a single transformation step, selecting simultaneously for leucine and histidine prototrophy. This is particularly useful when the original centric and acentric YAC arms are in opposite orientation to that shown in Figure 16. This YAC is isolated and introduced into ES cells by microinjection as described previously for embryos.

#### EXAMPLE VIII

##### Crossbreeding of transgenic mice

##### A. Generation of human monoclonal antibody producing mice



Mice containing the human immunoglobulin locus are mated to mice with inactivated murine immunoglobulin genes to generate mice that produce only human antibodies. Starting with four heterozygous strains, three generations of breeding are required to create a mouse that is homozygous for inactive murine kappa and heavy chain immunoglobulins, and heterozygous for human heavy and kappa chain immunoglobulin loci. The breeding scheme is shown in Figure 17.

#### EXAMPLE IX

##### Production of Human Monoclonal Antibodies

###### A. Immunization of mice

Germline chimeric mice containing integrated human DNA from the immunoglobulin loci are immunized by injection of an antigen in adjuvant. The mice are boosted with antigen 14 days after the primary immunization, repeated after 35 and 56 days. A bleed is done on the immunized animals to test the titer of serum antibodies against the immunizing antigen. The mouse with the highest titer is sacrificed, and the spleen removed.

###### B. Fusion of splenocytes

Myeloma cells used as the fusion partner for the spleen cells are thawed 6 days prior to the fusion, and grown in tissue culture. One day before the fusion, the cells are split into fresh medium containing 10% fetal calf serum at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/ml. On the morning of the fusion the cells are diluted with an equal volume of medium supplemented with 20% fetal calf serum and 2X OPI (3 mg/ml oxaloacetate, 0.1 mg/ml sodium pyruvate and 0.4 IU/ml insulin) solution.

After sacrificing the mouse, the spleen is aseptically removed, and placed in a dish with culture medium. The cells are teased apart until the spleen is torn into fine pieces and most cells have been removed.





The cells are washed in fresh sterile medium, and the clumps allowed to settle out.

5       The splenocytes are further washed twice by centrifugation in medium without serum. During the second wash, the myeloma cells are also washed in a separate tube. After the final wash the two cell pellets are combined, and centrifuged once together.

10       A solution of 50% polyethylene glycol (PEG) is slowly added to the cell pellet while the cells are resuspended, for a total of two minutes. 10 ml of prewarmed medium is added to the cell solution, stirring slowly for 3 minutes. The cells are centrifuged and the supernatant removed. The cells are resuspended in 10 ml of medium supplemented with 20% fetal calf serum, 1X OPI solution  
15       and 1X AH solution (58  $\mu$ M azaserine, 0.1 mM hypoxanthine). The fused cells are aliquoted into 96-well plates, and cultured at 37° for one week.

20       Supernatant is aseptically taken from each well, and put into pools. These pools are tested for reactivity against the immunizing antigen. Positive pools are further tested for individual wells. When a positive well has been identified, the cells are transferred from the 96-well plate to 0.5 ml of medium supplemented with 20% fetal calf serum, 1X OPI, and 1X AH in a 24-well plate.  
25       When that culture becomes dense, the cells are expanded into 5 ml, and then into 10 ml. At this stage the cells are sub-cloned so that a single antibody producing cell is in the culture.

30       In accordance with the above procedures, a chimeric non-human host, particularly a murine host, may be produced which can be immunized to produce human antibodies or analogs specific for an immunogen. In this manner, the problems associated with obtaining human monoclonal antibodies are avoided, because the transgenic  
35       host can be immunized with immunogens which could not be used with a human host. Furthermore, one can provide for booster injections and adjuvants which would not be



permitted with a human host. The resulting B-cells may then be used for immortalization for the continuous production of the desired antibody. The immortalized cells may be used for isolation of the genes encoding the immunoglobulin or analog and be subjected to further molecular modification by methods such as in-vitro mutagenesis or other techniques to modify the properties of the antibodies. These modified genes may then be returned to the immortalized cells by transfection to provide for a continuous mammalian cellular source of the desired antibodies. The subject invention provides for a convenient source of human antibodies, where the human antibodies are produced in analogous manner to the production of antibodies in a human host. The animal host cells conveniently provide for the activation and rearrangement of human DNA in the host cells for production of human antibodies.

In accordance with the subject invention, human antibodies can be produced to human immunogens, eg. proteins, by immunization of the subject host mammal with human immunogens. The resulting antisera will be specific for the human immunogen and may be harvested from the serum of the host. The immunized host B cells may be used for immortalization, eg. myeloma cell fusion, transfection, etc. to provide immortal cells, eg. hybridomas, to produce monoclonal antibodies. The antibodies, antiserum and monoclonal antibodies will be glycosylated in accordance with the species of the cell producing the antibodies. Rare variable regions of the Ig locus may be recruited in producing the antibodies, so that antibodies having rare variable regions may be obtained.

All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference.



Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.



## CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An improved method for modifying the genome of a embryonic stem cell so as to contain, in the genome thereof, a xenogeneic DNA segment of at least 100 kb which method comprises:

combining under fusing conditions embryonic stem cells and yeast spheroplasts, said spheroplasts containing a yeast artificial chromosome (YAC) comprising said xenogeneic DNA segment and including a marker for selection, whereby said xenogeneic DNA segment becomes integrated into the genome of said embryonic stem cells; and

selecting for an embryonic stem cell carrying said xenogeneic DNA segment by means of the marker.

2. An improved method for producing a modified non-human animal, said animal having a xenogeneic DNA segment of at least 100 kb stably integrated into the genome of at least some cells of said animal, said method comprising:

combining under fusing conditions embryonic stem cells of said animal and yeast spheroplasts, said spheroplasts containing a yeast artificial chromosome (YAC) comprising said xenogeneic DNA segment and including a marker for selection, whereby said xenogeneic DNA segment becomes integrated into the genome of said embryonic stem cells;

selecting for embryonic stem cells carrying said xenogeneic DNA segment by means of the marker; and

transferring said selected embryonic cells into a host blastocyst, implanting said blastocyst in a pseudopregnant animal recipient, and allowing said blastocyst to develop to term to produce a chimeric animal carrying said xenogeneic DNA segment integrated into the genome of at least some cells of said animal.





3. An improved method for producing a modified non-human animal, said animal having a xenogeneic DNA segment of at least 100 kb stably integrated into the genome of said animal, said method  
5 comprising:

combining under fusing conditions embryonic stem cells of said animal and yeast spheroplasts, said spheroplasts containing a yeast artificial chromosome (YAC) comprising said xenogeneic DNA segment and  
10 including a marker for selection, whereby said xenogeneic DNA segment becomes integrated into the genome of said embryonic stem cells;

selecting for embryonic stem cells carrying said xenogeneic DNA segment by means of the marker;  
15 transferring said selected embryonic cells into a host blastocyst and implanting said blastocyst in a pseudopregnant animal recipient, and allowing said blastocyst to develop to term to produce a chimeric animal carrying said xenogeneic DNA segment; and

20 mating said chimeric animal with an animal of the same species to produce said modified animal carrying said xenogeneic DNA segment.

4. A method according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said marker is the HPRT gene and said  
25 embryonic stem cells are HPRT deficient.

5. A method according to any of claims 1, 2 or 3, wherein said xenogeneic DNA is human DNA, and/or  
wherein said xenogeneic DNA is immunoglobulin DNA in substantially intact form.

30 6. Embryonic stem cells comprising a genome modified according to the method of claims 1, 4 or 5.

7. A modified animal produced according to the method of claims 2, 3, 4 or 5.



8. The stem cells of claim 6 which are of a rodent.

9. The stem cells of claim 8 which are murine.

10. The animal of claim 7 which is a rodent.

5

11. The animal of claim 10 which is a mouse.



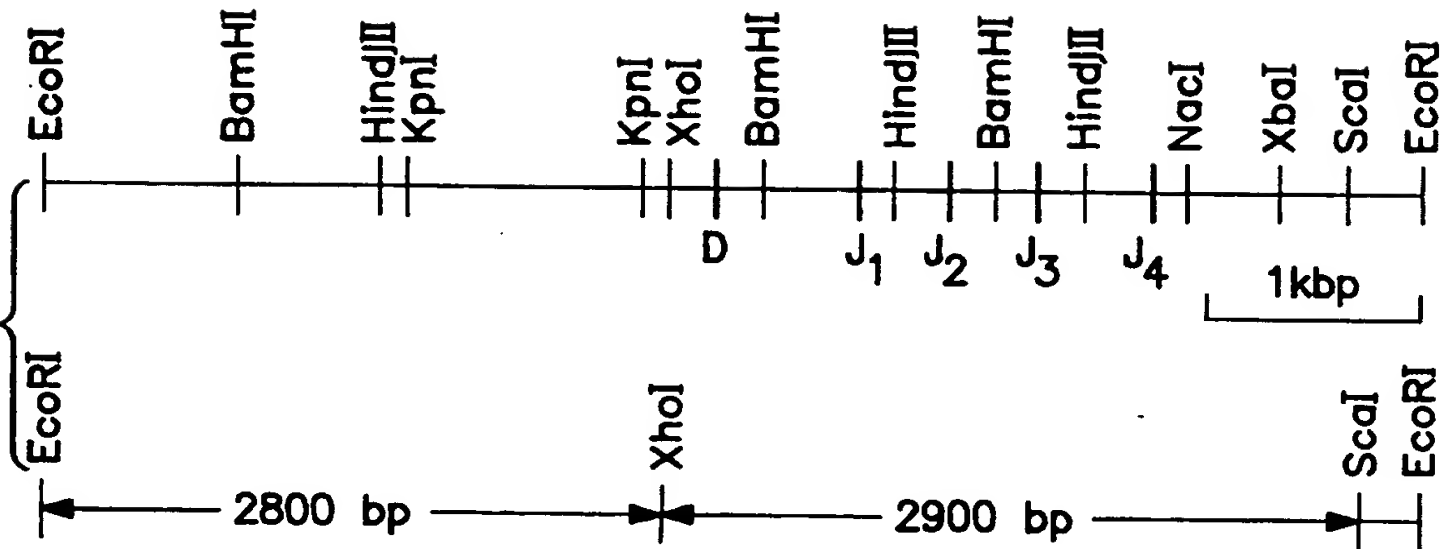


FIG. IA

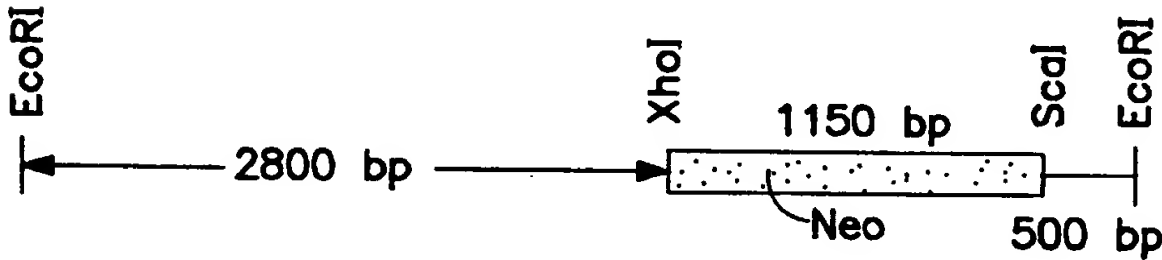


FIG. IB



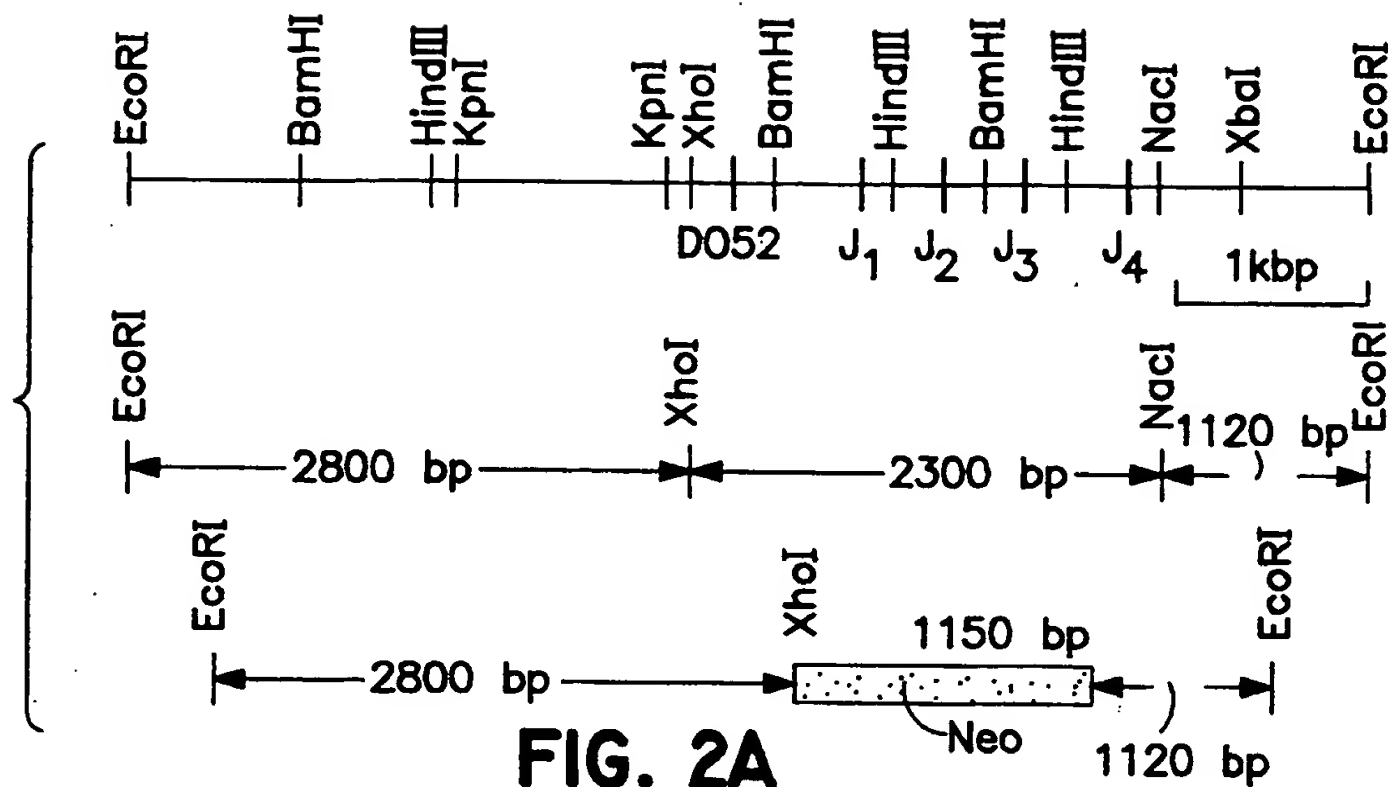


FIG. 2A

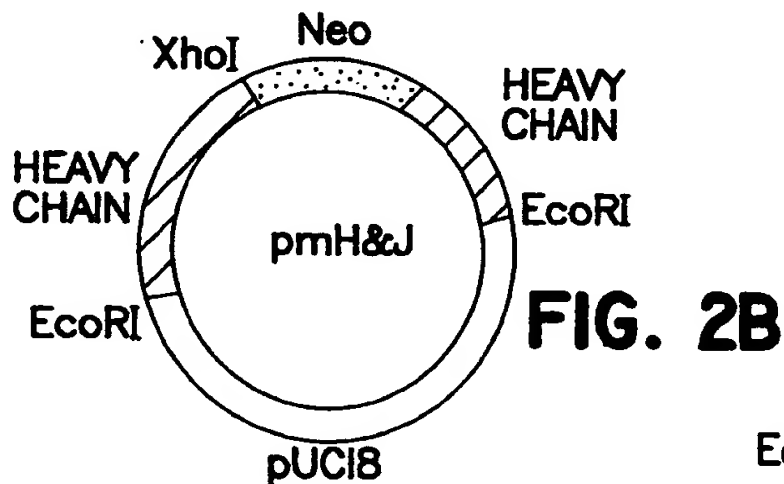


FIG. 2B

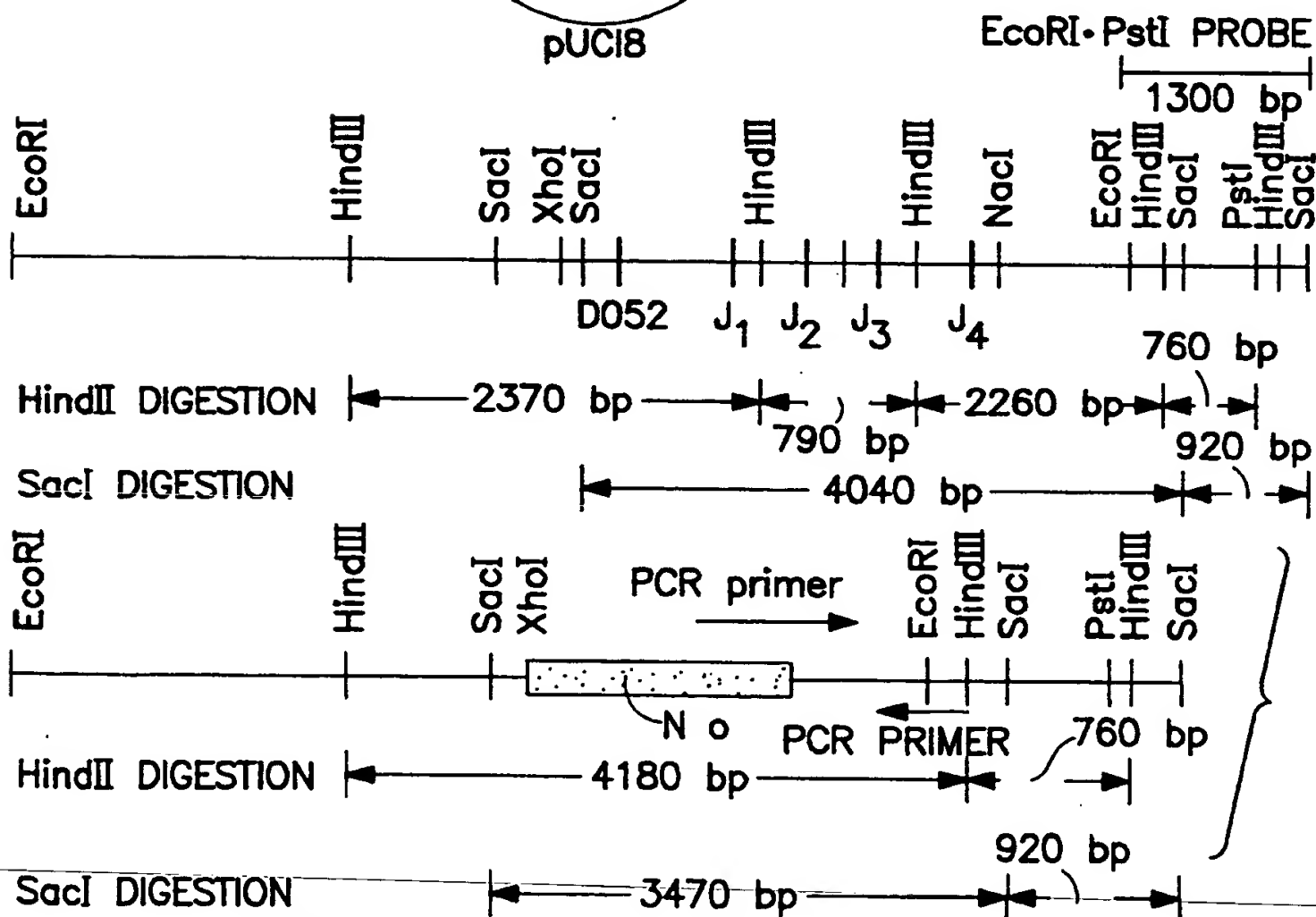


FIG. 2C





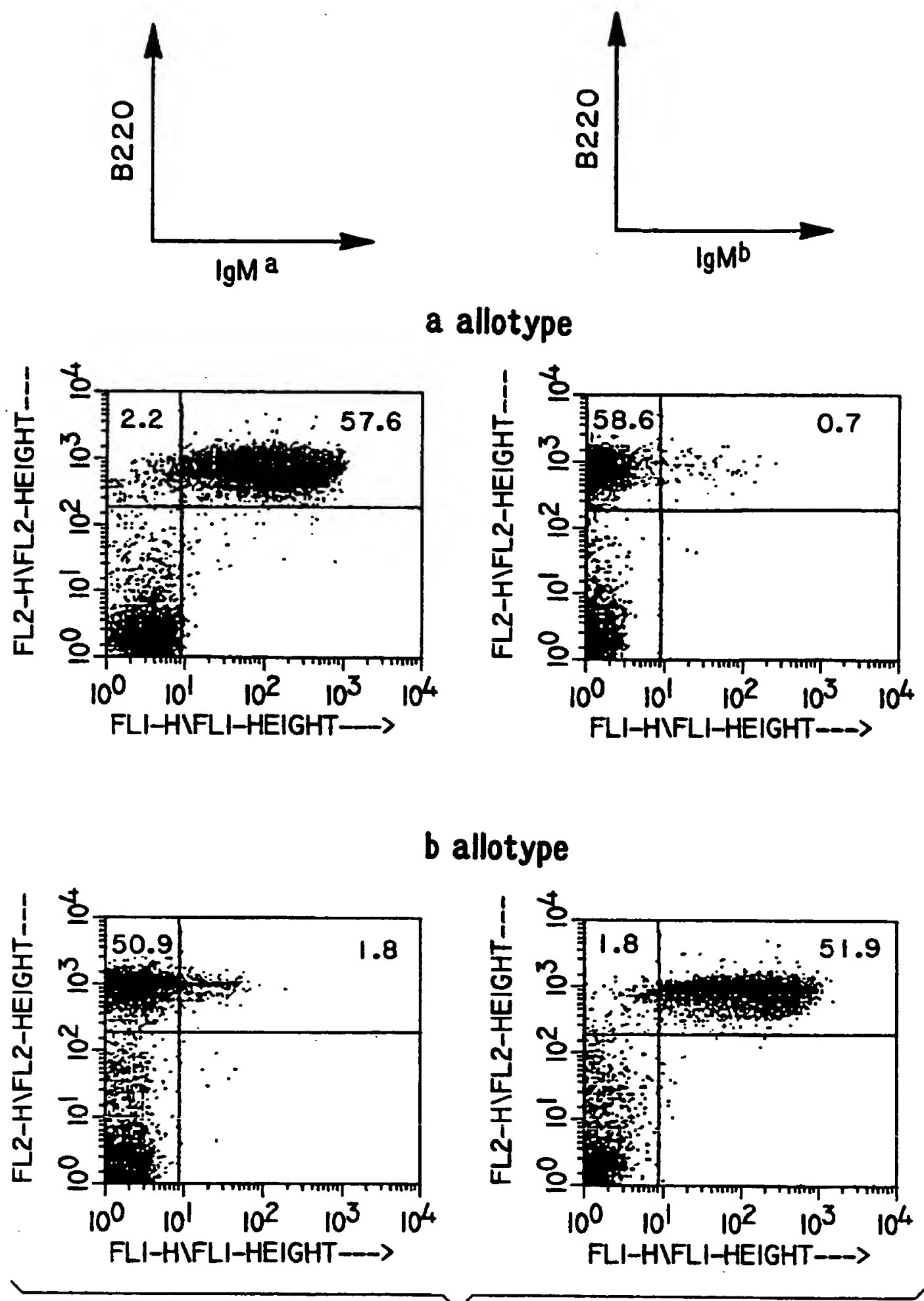


FIG. 3-1



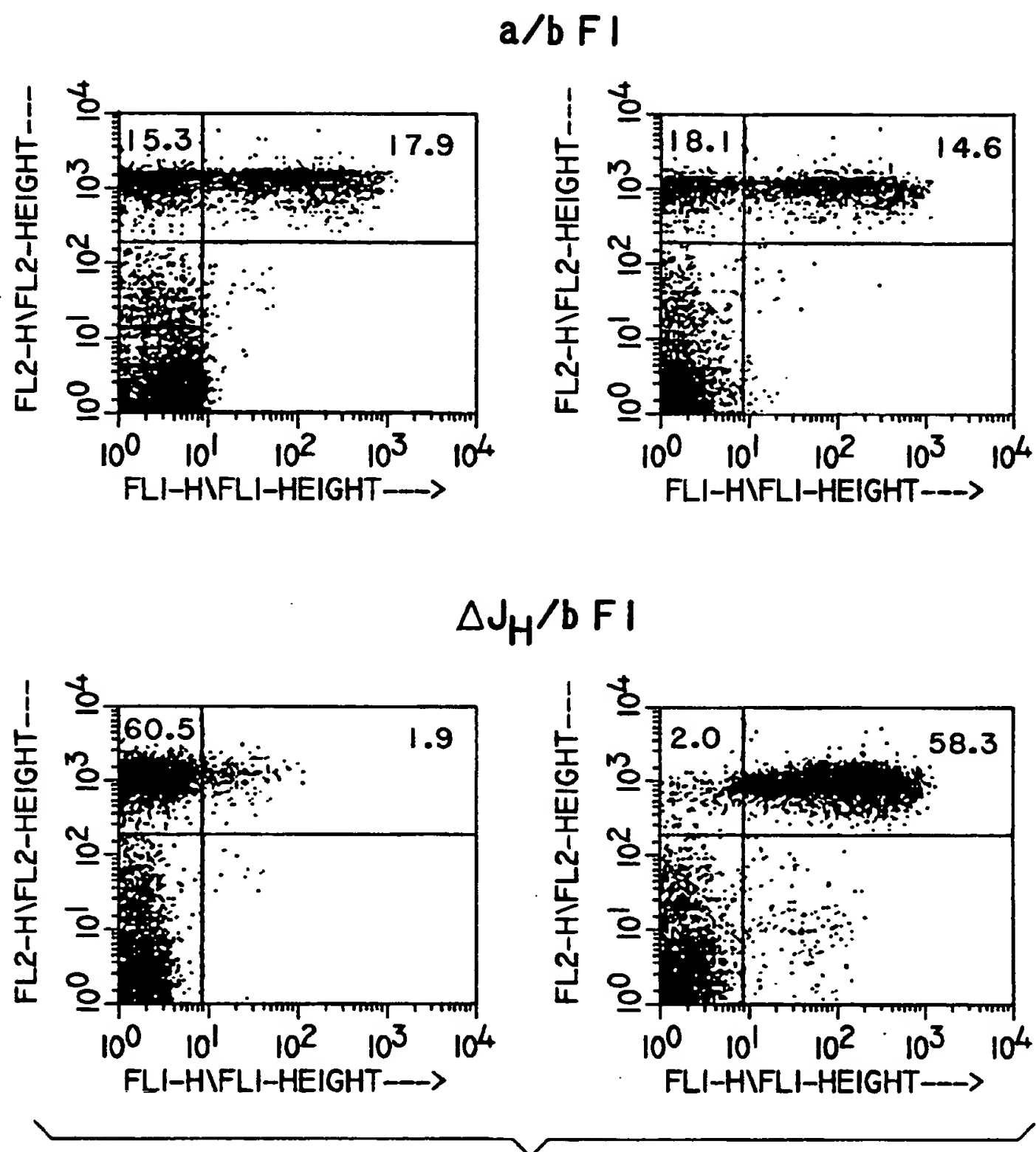


FIG. 3-2



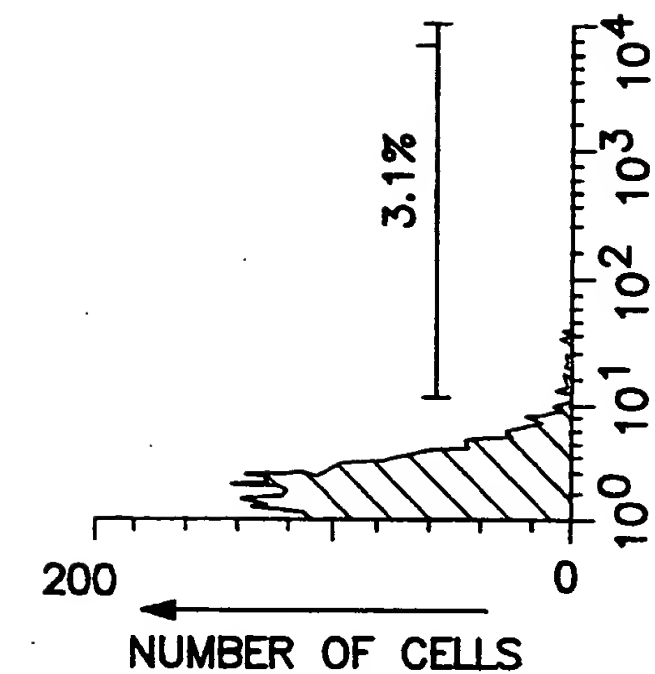


FIG. 4C

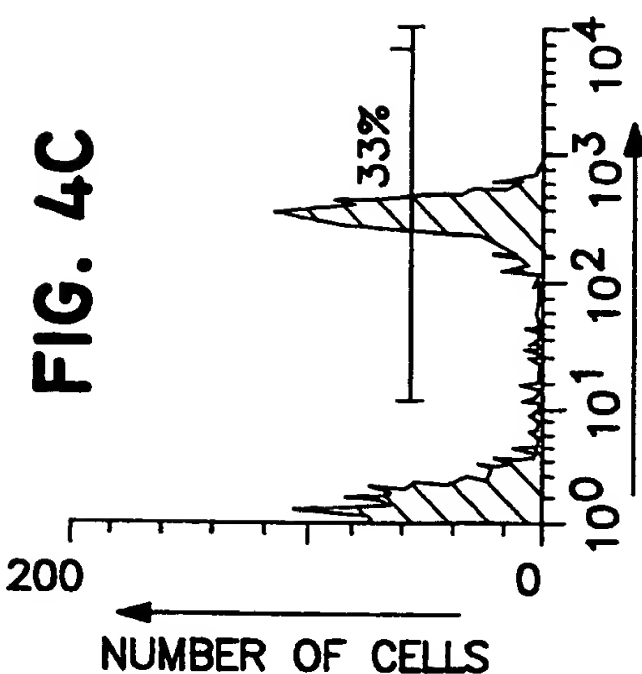


FIG. 4F

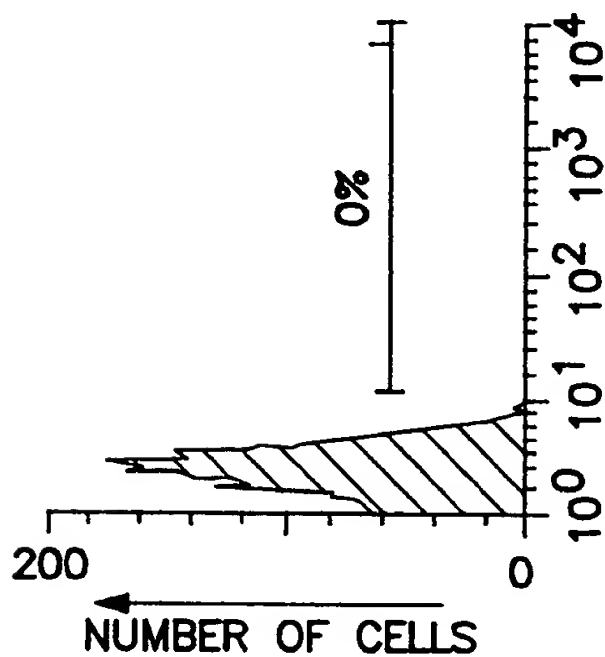


FIG. 4B

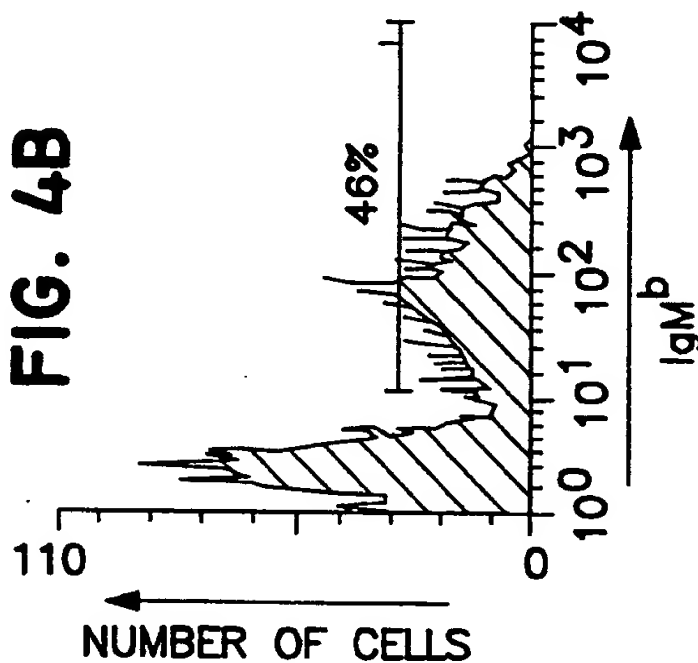


FIG. 4E

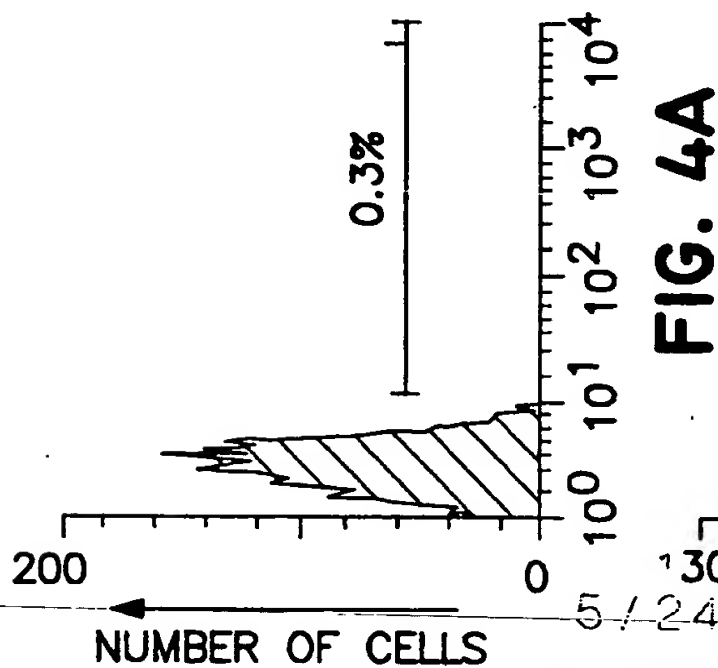


FIG. 4A

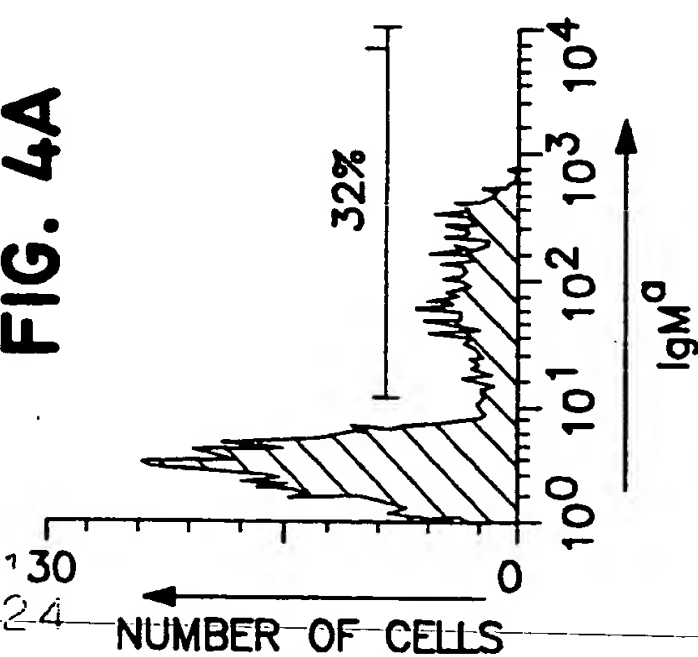


FIG. 4D



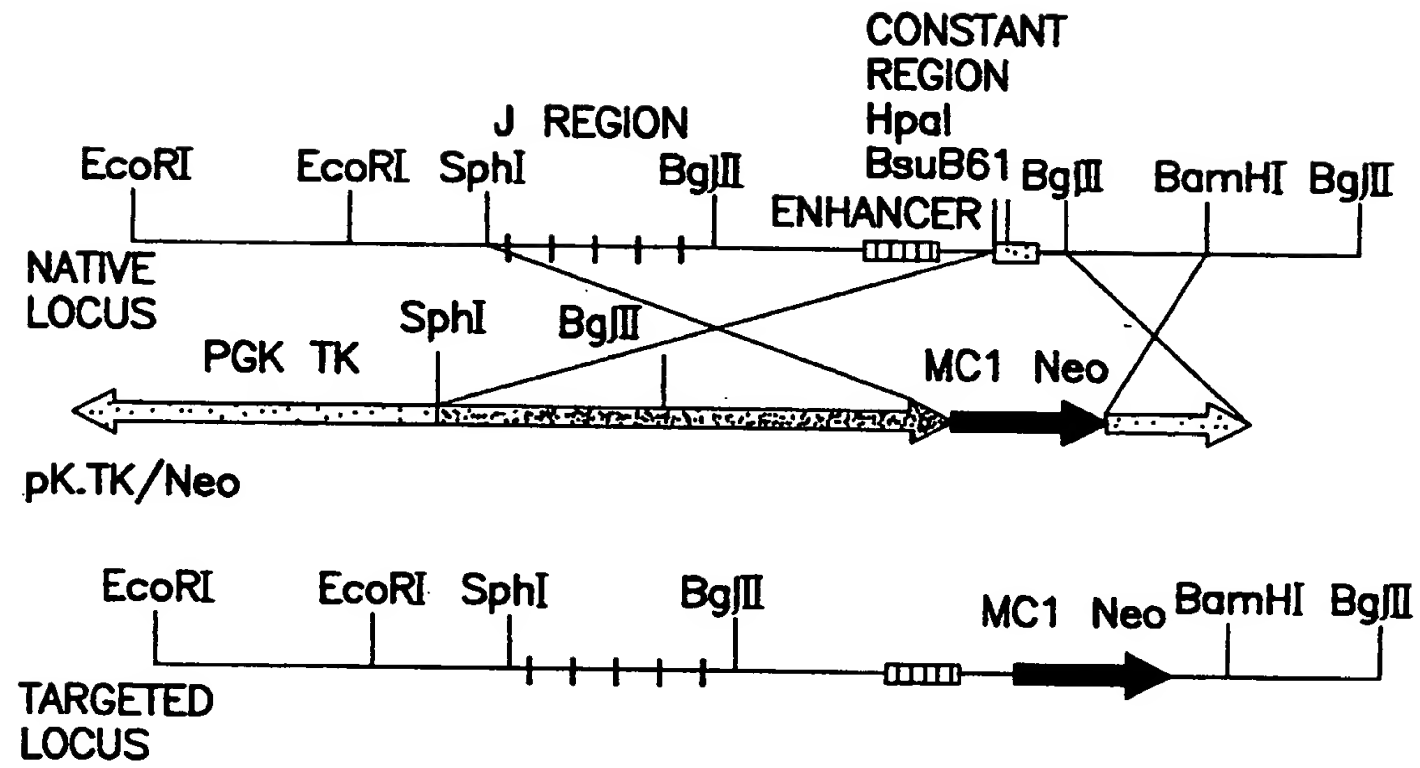
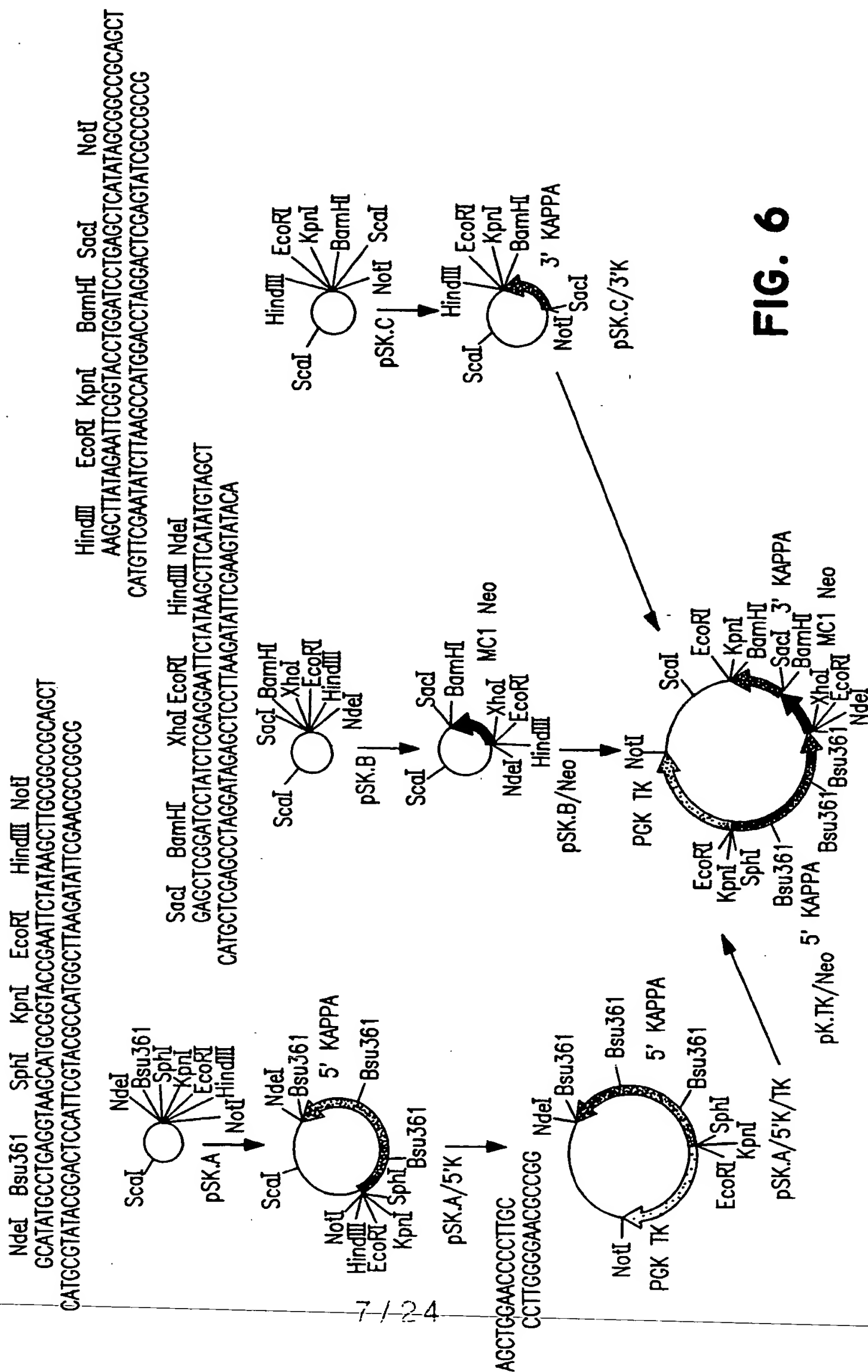


FIG. 5







**FIG. 6**



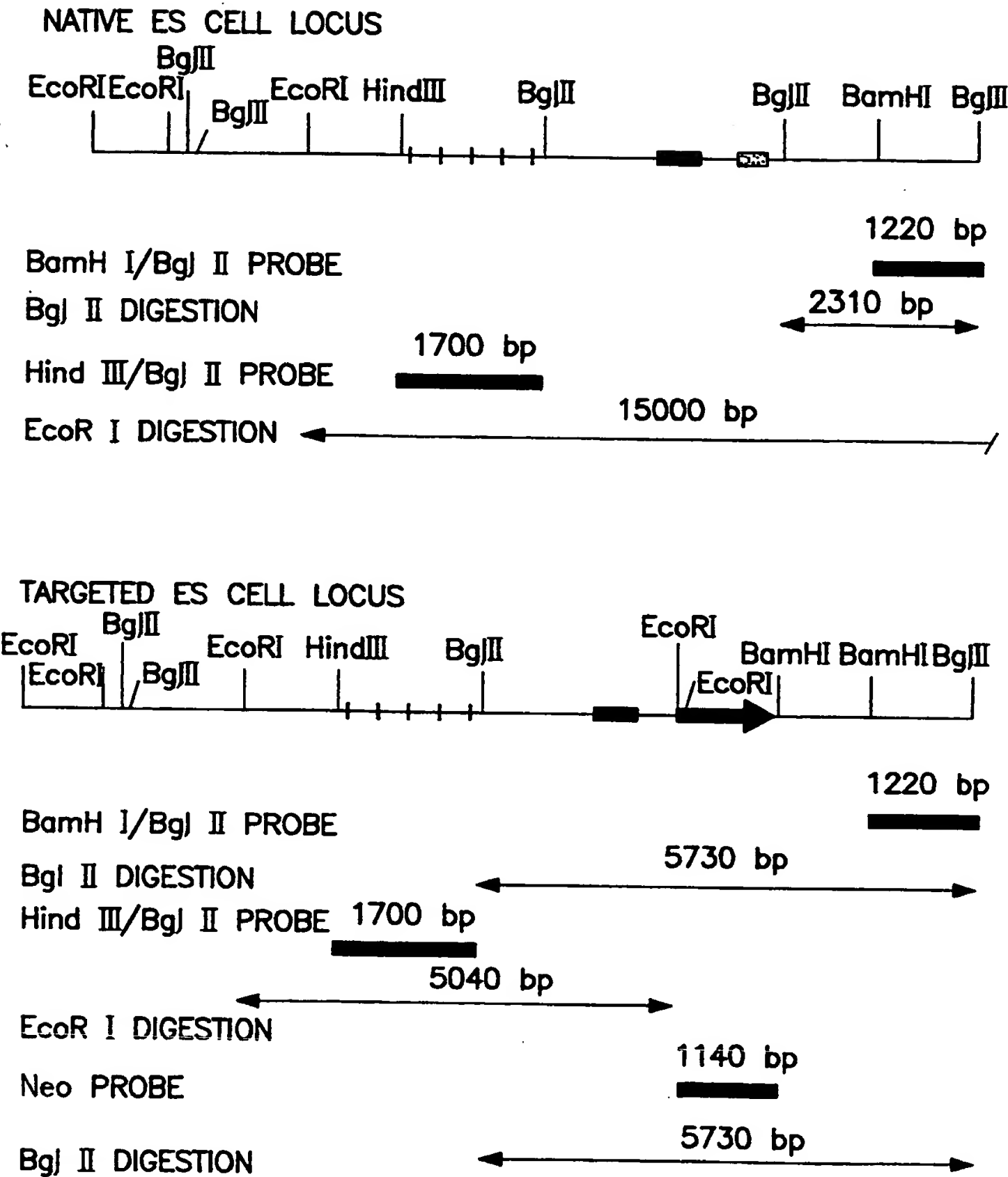
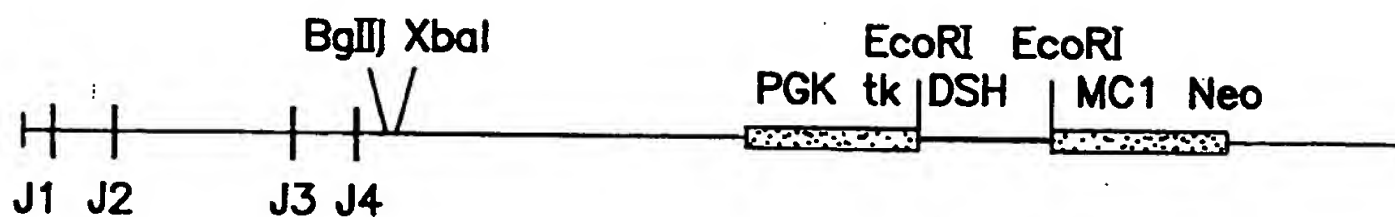


FIG. 7



## J REGION KNOCKOUT VECTOR



## TARGETING SCHEME

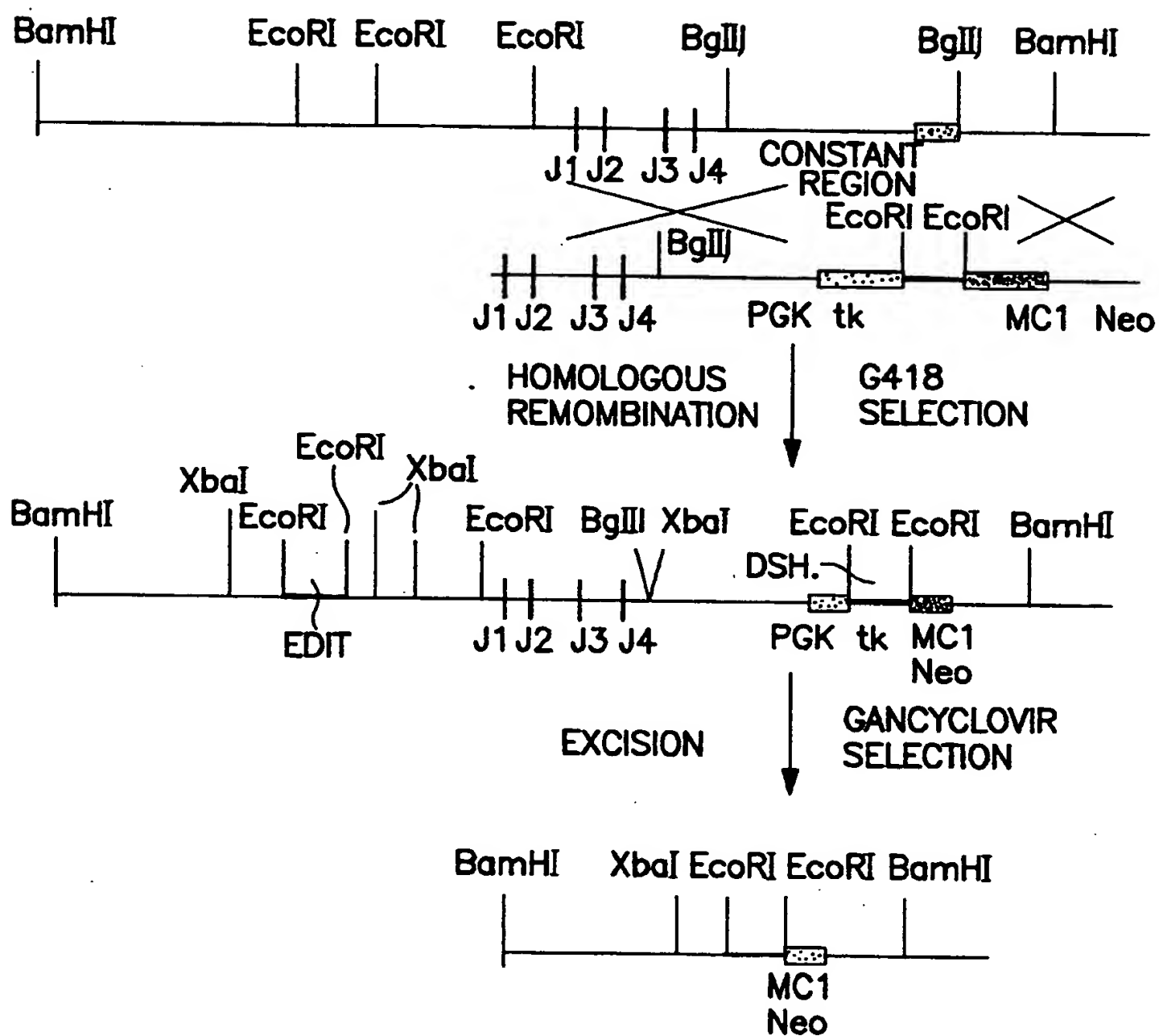


FIG. 8



NdeI Bsu361 SphI KpnI EcoRI HindIII NotI  
 GCATATGCCTGAGGTAGCATGCGTACCGAATTCATAAGCTTGGCGCCGAGCT  
 CATGCGTATACGGACTCCATTCGTACGCCATGCTTAAGATATTCGAACGCCGCGG

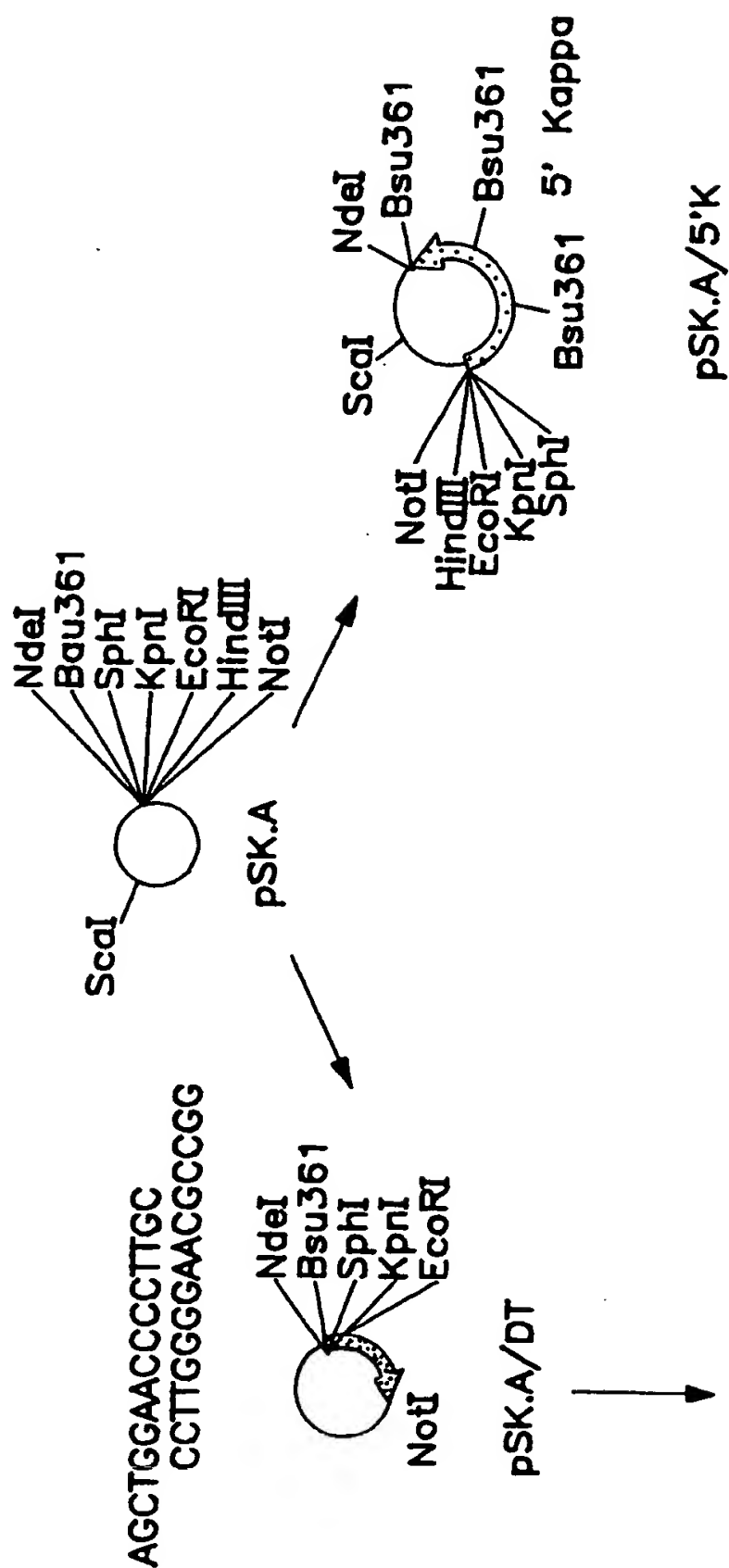


FIG. 9-I





SacI BamHI XhoI EcoRI HindIII NdeI  
 GAGCTCGGATCCTATCTCGAGGAATTCTATAAGCTTCATATGTAGCT  
 CATCCTCGAGCCTAGGATAGAGCTCCTTAAGATATTCGAAGTATACA

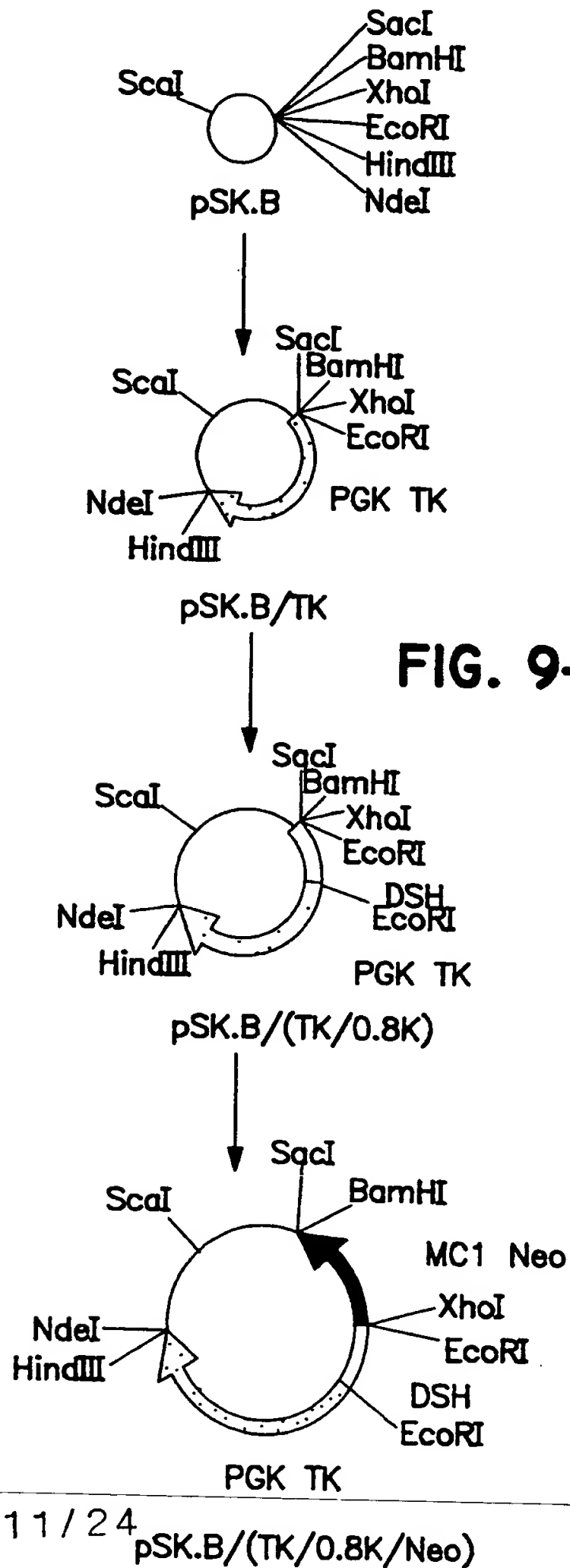


FIG. 9-2



HindIII   EcoRI   KpnI   BamHI   SacI   NotI  
AAGCTTATAGAATTCGGTACCTGGATCCTGAGCTCATAGCGGCCGCAGCT  
CATGTTCGAATATCTTAAGCCATGGACCTAGGACTCGAGTATCGCCGGCG

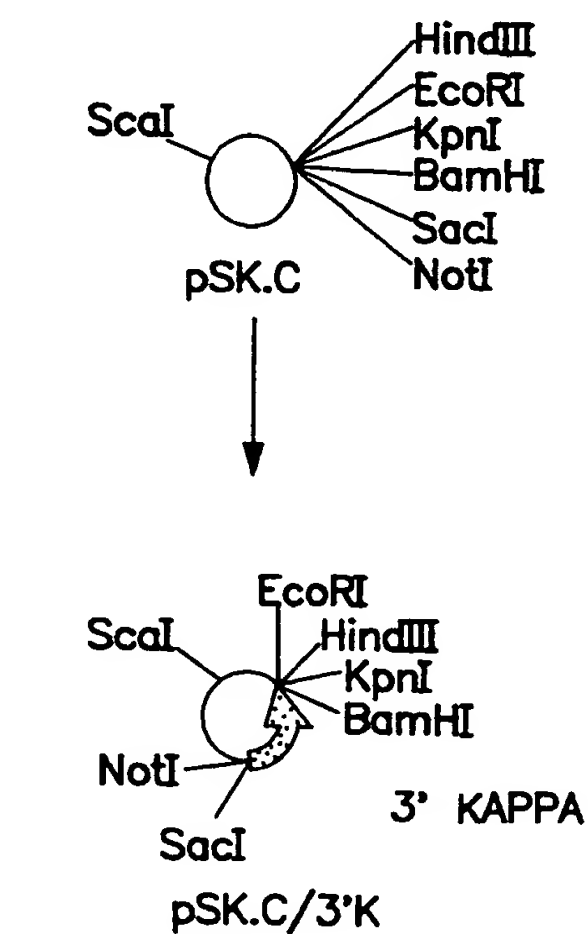
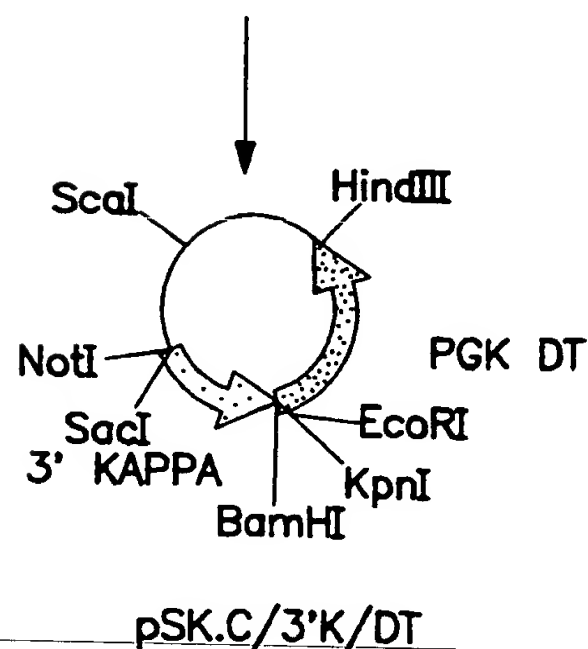
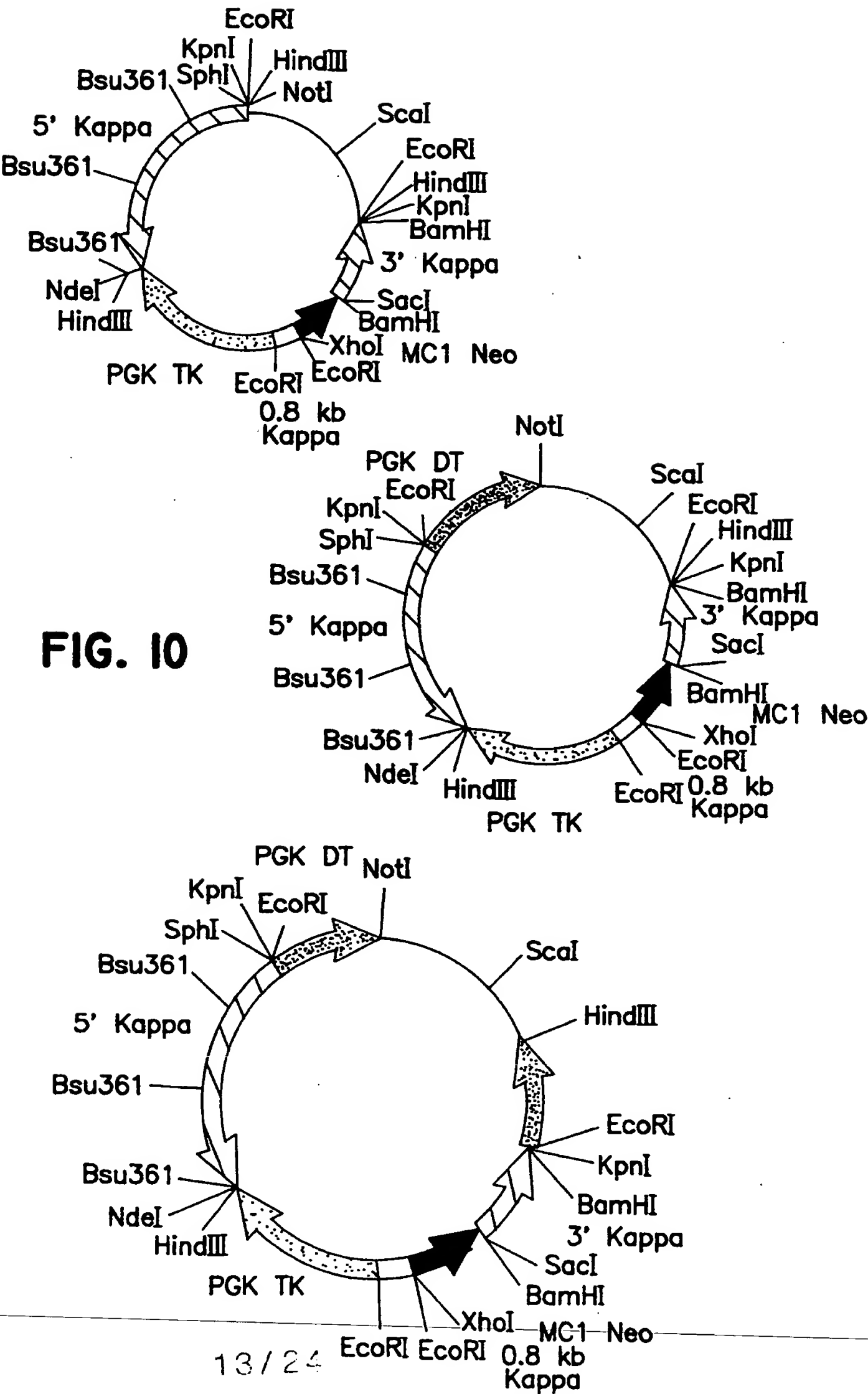


FIG. 9-3









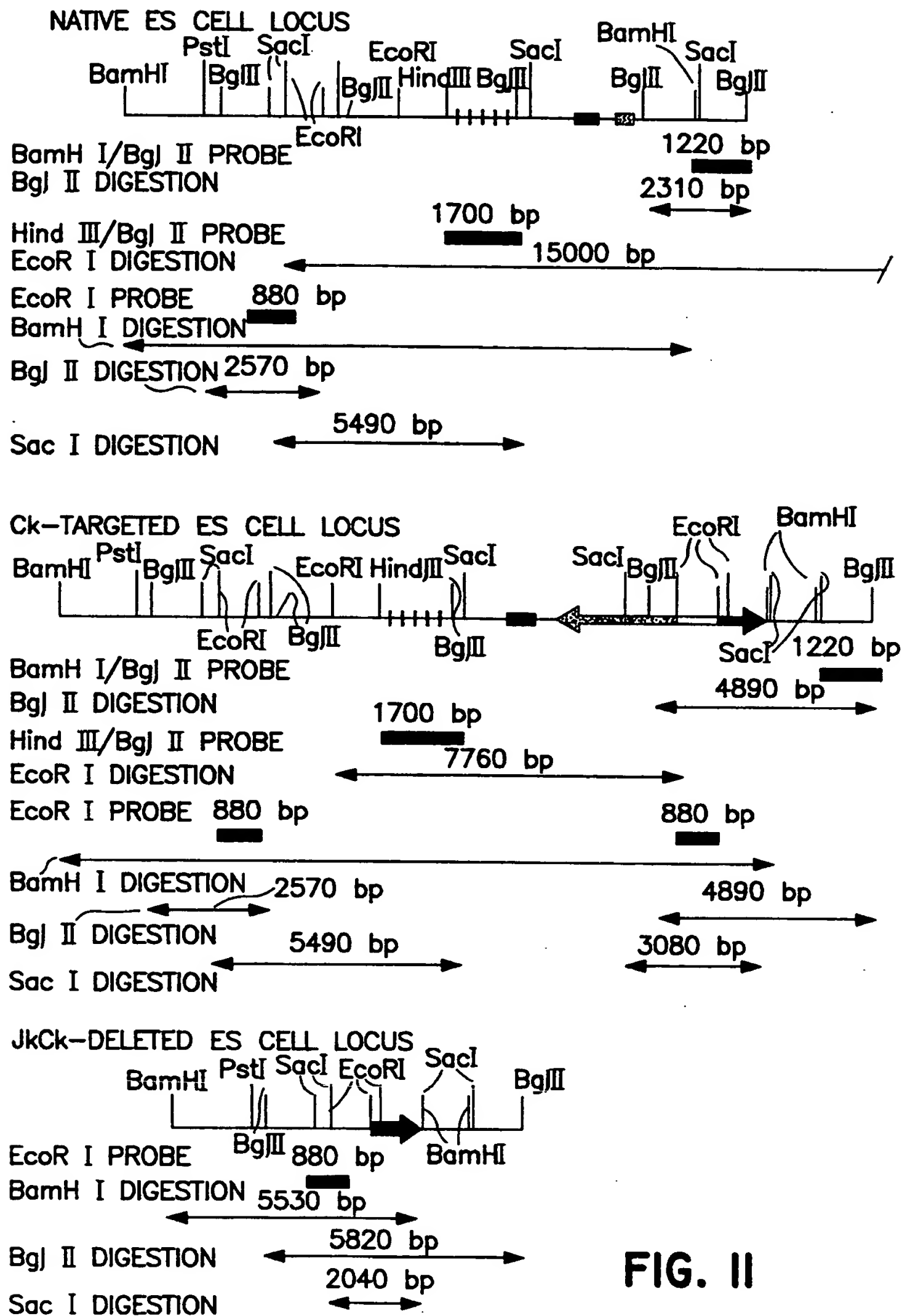


FIG. II





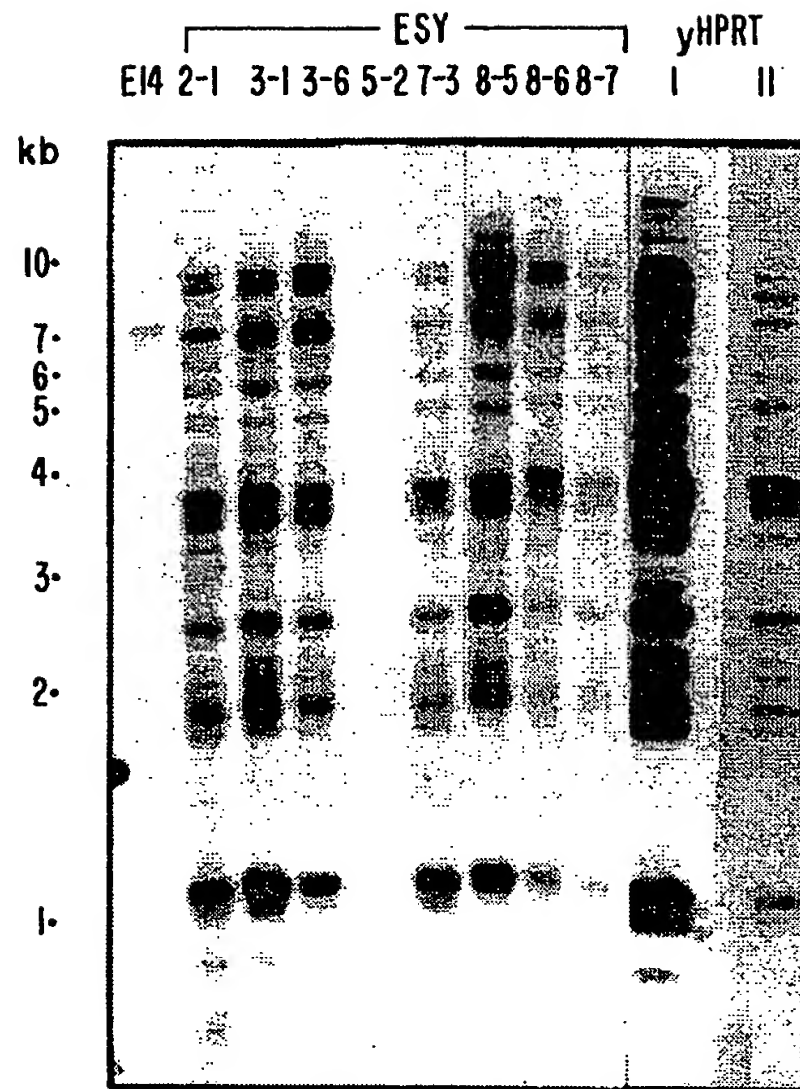


FIG. 12A

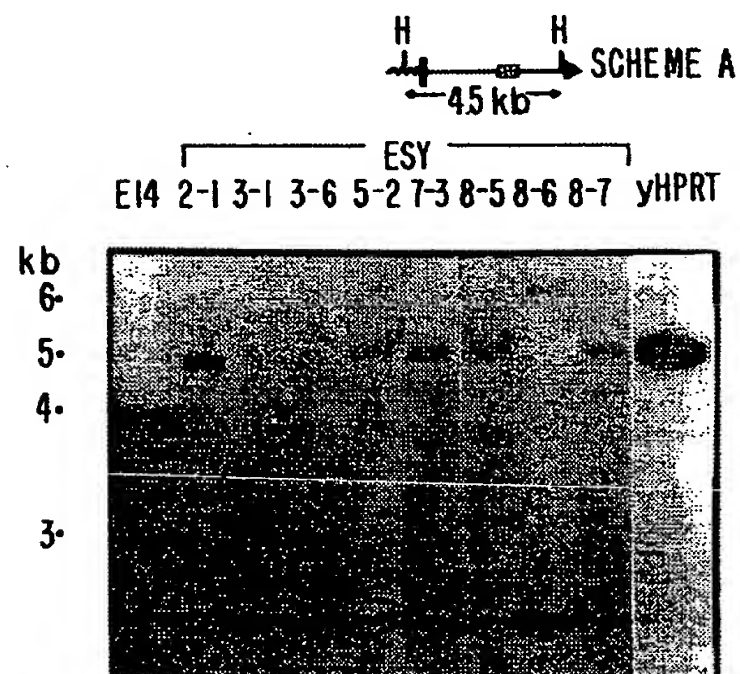


FIG. 12B



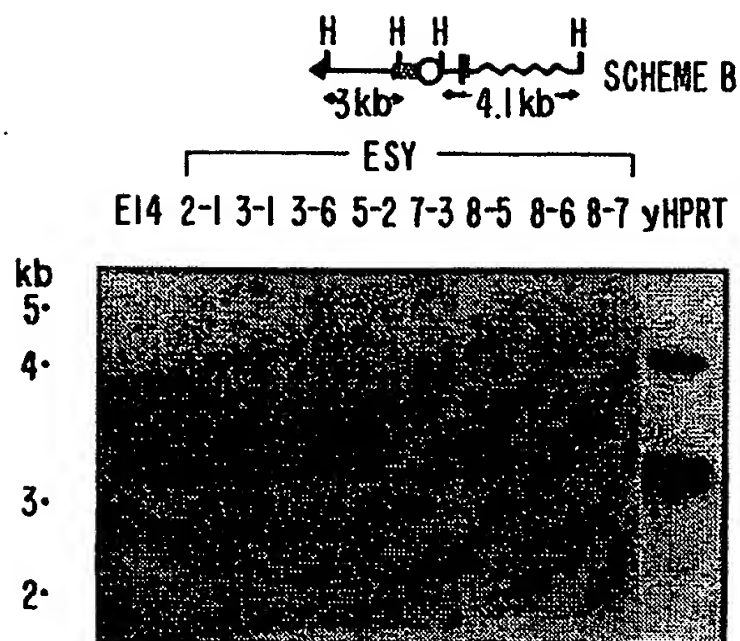


FIG. 12C

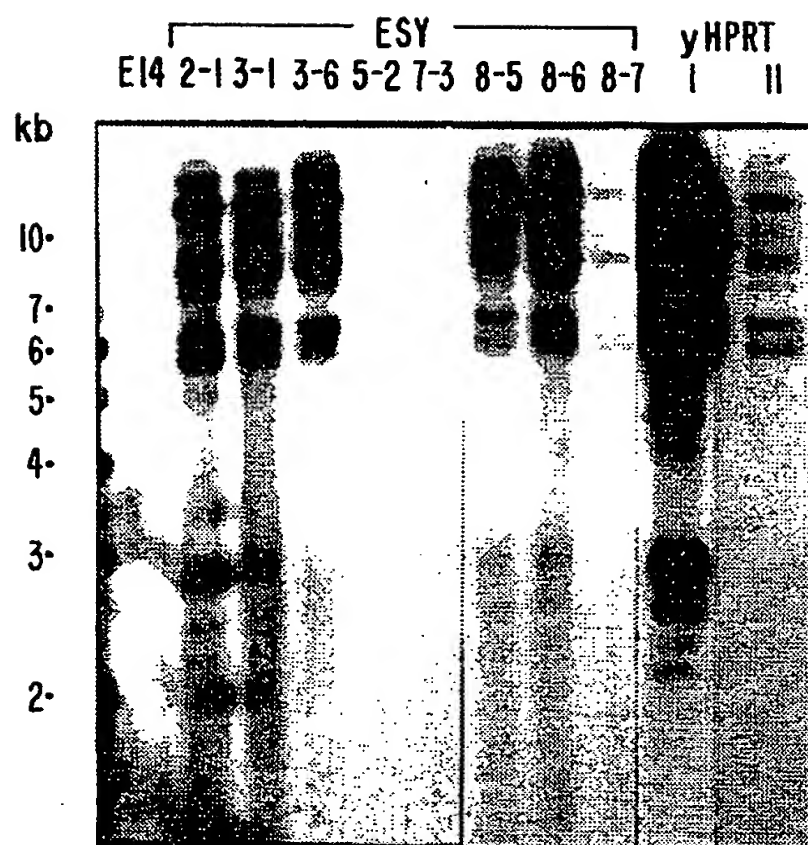


FIG. 12D

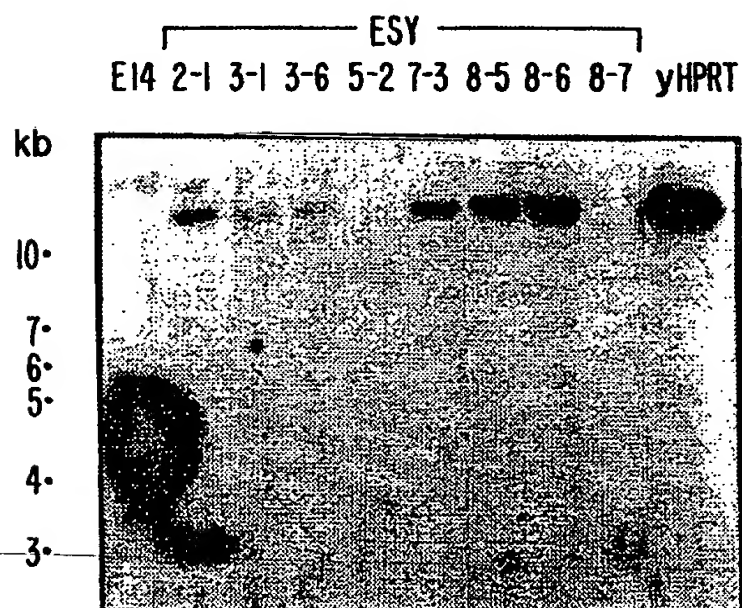


FIG. 12E



FIG. 13A

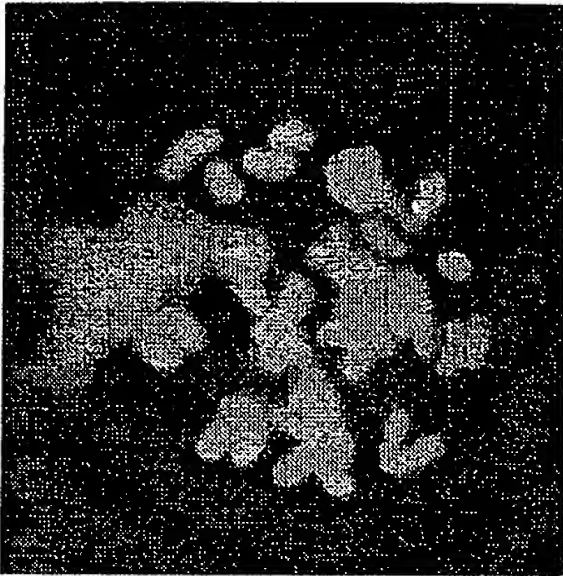


FIG. 13B

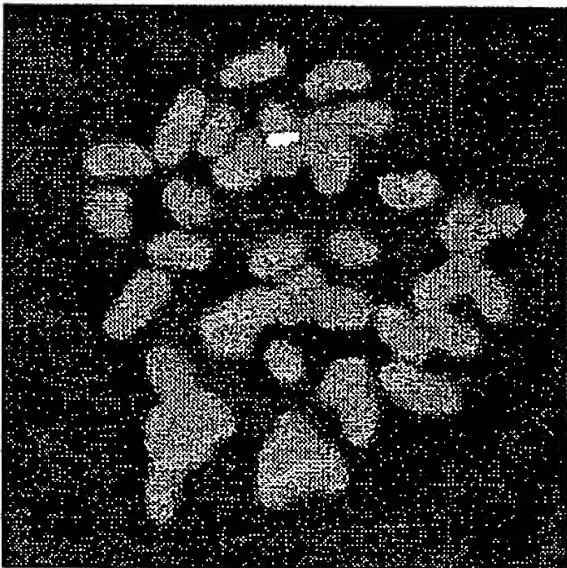
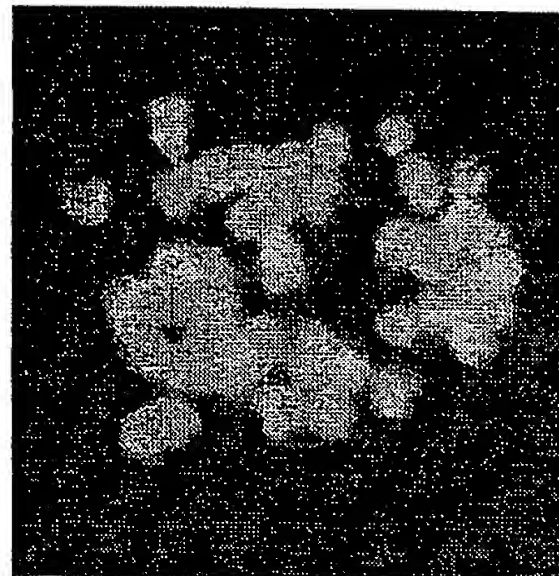


FIG. 13C

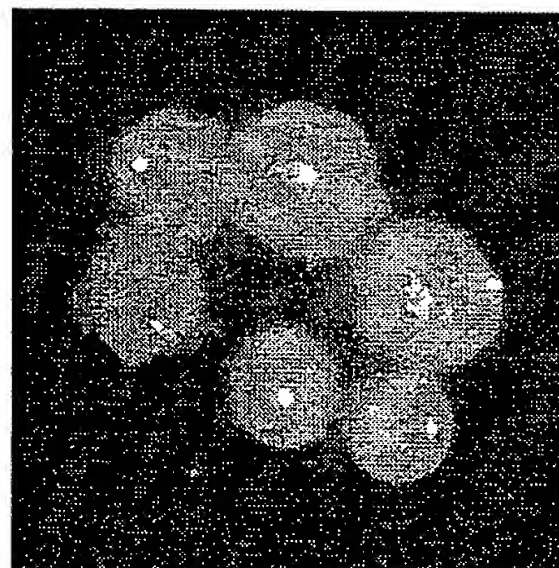


FIG. 13D





FIG. 14A



FIG. 14B



FIG. 14C

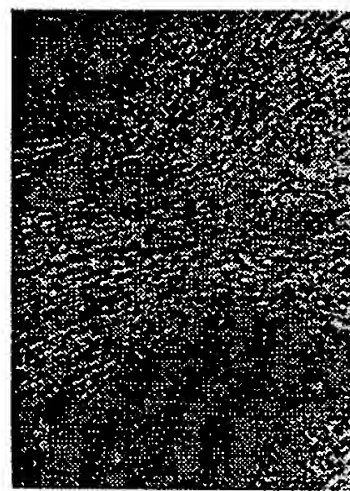


FIG. 14D

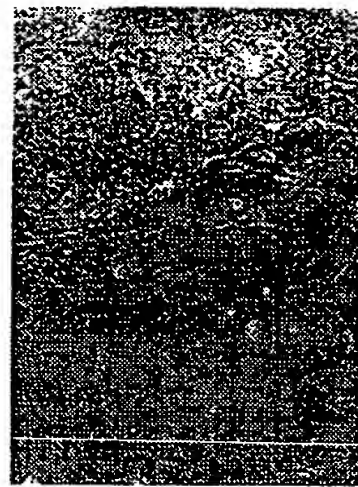


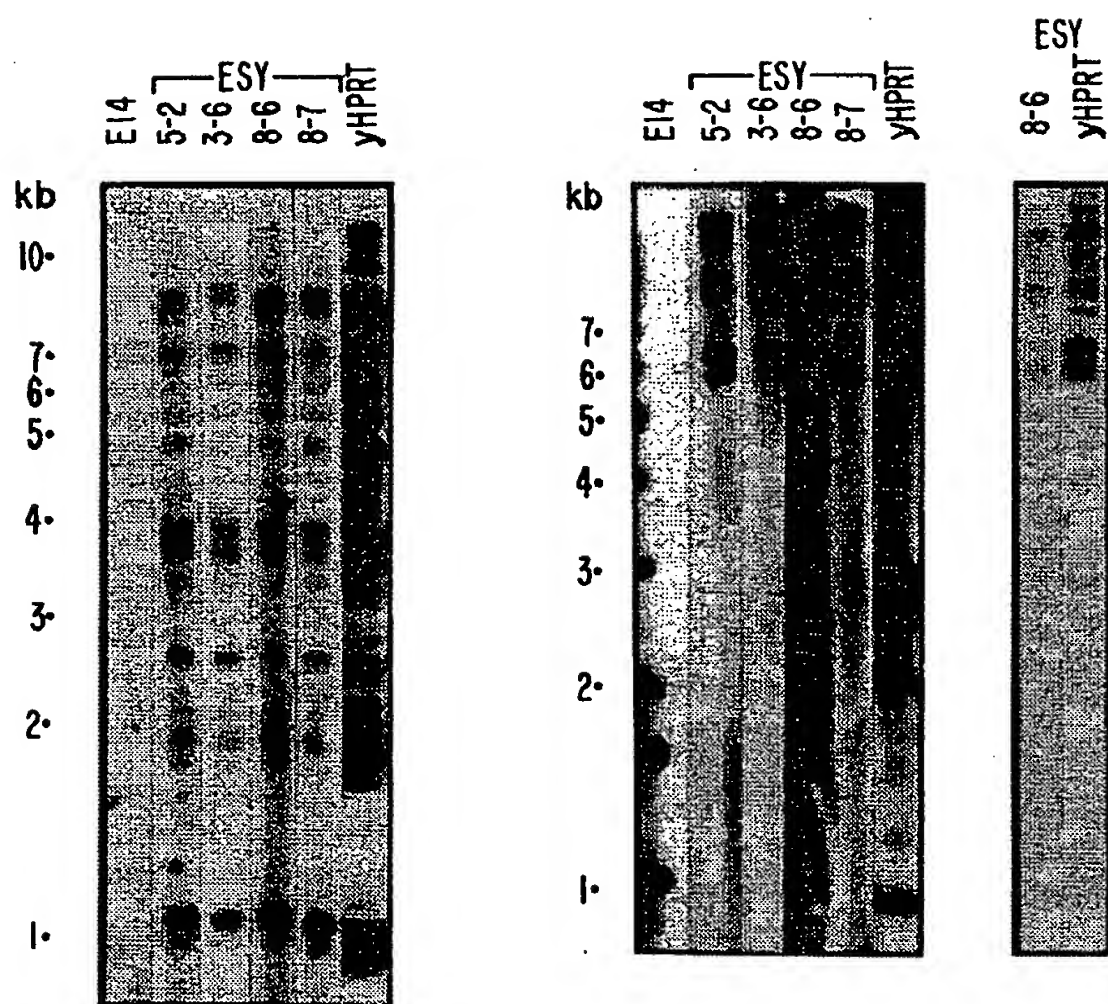
FIG. 14E



FIG. 14F







THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 14J

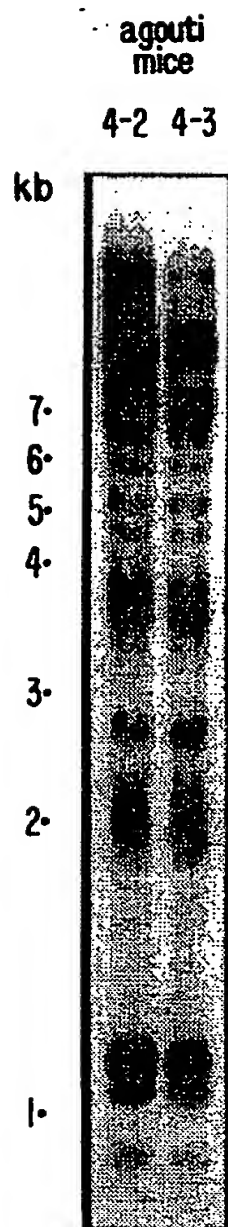


FIG. 14K

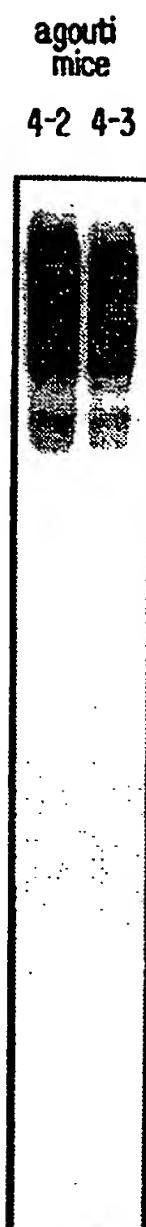


FIG. 15A

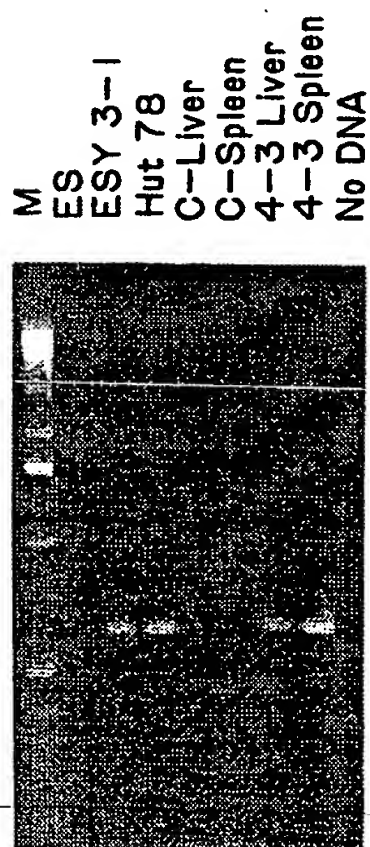
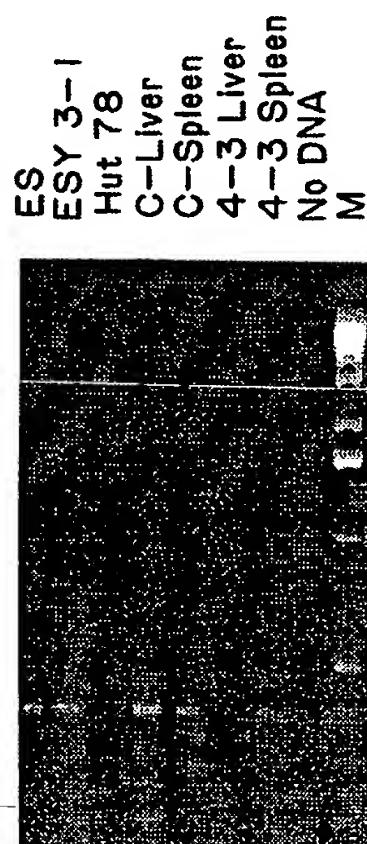


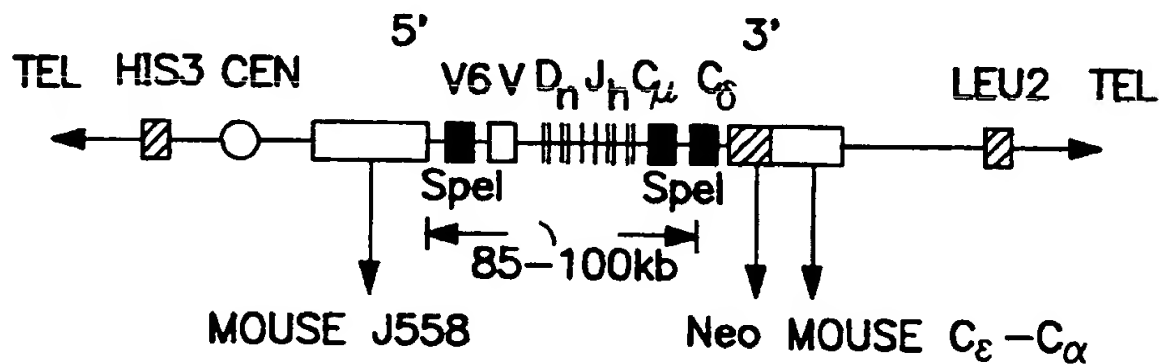
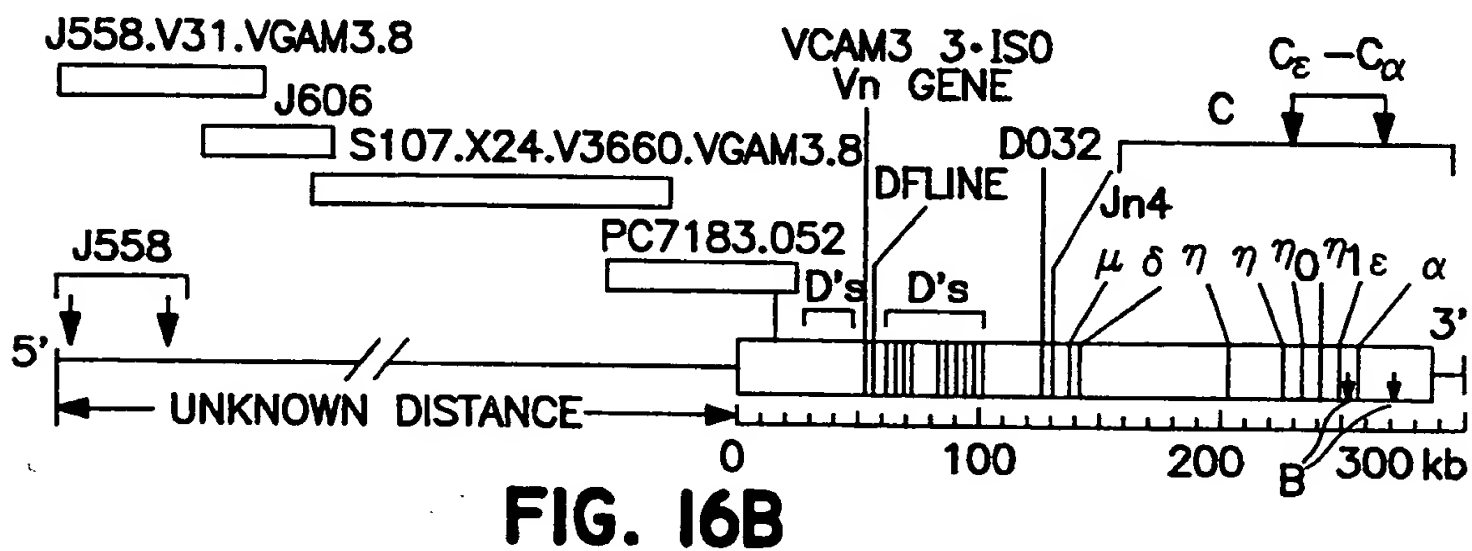
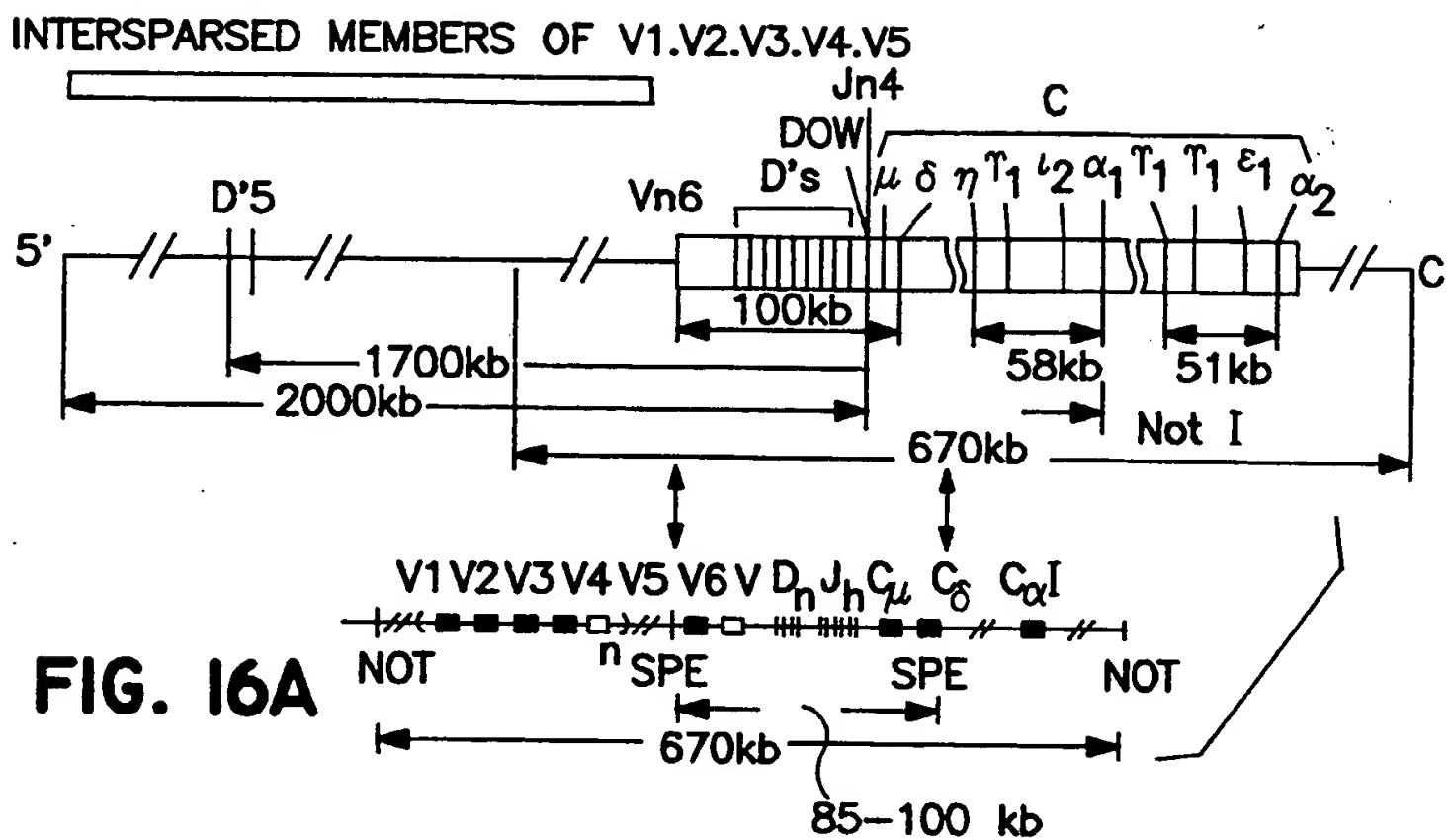
FIG. 15B



626 bp

359 bp

THIS PAGE BLANK (USPTO)



**FIG. 16C** 21/24

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# Mouse Breeding Scheme

## Cross IA.

heterozygous inactive Murine IgH  
 $\times$   
heterozygous inactive Murine IgK

<u>MIgH (inactive)</u>	<u>MIgK</u>
<u>MIgH</u>	<u>MIgK</u>
$\times$	
<u>MIgH</u>	<u>MIgK (inactive)</u>
$\downarrow$	<u>MIgK</u>

F1 (cross I A)

<u>MIgH (inactive)</u>	<u>MIgK (inactive)</u>
<u>MIgH</u>	<u>MIgK</u>

## Cross II.

F1 (cross I A) x F1 (cross I B)

$\downarrow$

F2 Quadruple Heterozygotes

<u>MIgH (inactive)</u>	<u>MIgK (inactive)</u>	<u>HIgH</u>	<u>HIgK</u>
<u>MIgH</u>	<u>MIgK</u>		

## Cross III.

Intercross F2 mice

$\downarrow$

F3 DOUBLE Homozygotes

<u>MIgH (inactive)</u>	<u>MIgK (inactive)</u>	<u>HIgH</u>	<u>HIgK</u>
<u>MIgH (inactive)</u>	<u>MIgK (inactive)</u>		

FIG. 17

THIS PAGE BLANK (USPTO)



MAMMALIAN HOST GENOTYPES **FIG. 18A**

<u>Hetero- or Hemi-zygous Mice</u>	<u>Intercross Product Mice *</u>
I. $\frac{\Delta mIgL}{mIgL} \frac{mIgH}{mIgH}$	$\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL} \frac{mIgH}{mIgH}$
II. $\frac{mIgL}{mIgL} \frac{\Delta mIgH}{mIgH}$	$\frac{mIgL}{mIgL} \frac{\Delta mIgH}{\Delta mIgH}$
III. $\frac{mIgL}{mIgL} \frac{mIgH}{mIgH} \underline{hIgH}$	$\frac{mIgL}{mIgL} \frac{mIgH}{mIgH} \underline{hIgH}$
IV. $\frac{mIgL}{mIgL} \frac{mIgH}{mIgH} \underline{hIgL}$	$\frac{mIgL}{mIgL} \frac{mIgH}{mIgH} \underline{hIgL}$
V. Animal I X Animal II	$\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL} \frac{\Delta mIgH}{\Delta mIgH}$
VI. Animal III X Animal V	$\frac{mIgL}{\Delta mIgL} \frac{mIgH}{\Delta mIgH} \underline{hIgH}$ and $\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL} \frac{\Delta mIgH}{\Delta mIgH} \underline{hIgH}$
VII. Animal IV X Animal V	$\frac{mIgL}{\Delta mIgL} \frac{mIgH}{\Delta mIgH} \underline{hIgL}$ and $\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL} \frac{\Delta mIgH}{\Delta mIgH} \underline{hIgL}$
VIII. Animal VI X Animal VII	$\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL} \frac{\Delta mIgH}{\Delta mIgH} \underline{hIgL} \underline{hIgH}$ and $\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL} \frac{\Delta mIgH}{\Delta mIgH} \underline{hIgL} \underline{hIgH}$

THIS PAGE BLANK

IX.	Animal III X Animal IV				
	$\frac{mIgL}{mIgL}$	$\frac{mIGH}{mIGH}$	$\frac{hIgL}{hIgL}$	$\frac{hIGH}{hIGH}$	
X.	Animal II X Animal IX				
	$\frac{mIgL}{mIgL}$	$\frac{\Delta mIGH}{\Delta mIGH}$	$\frac{hIgL}{hIgL}$	$\frac{hIGH}{hIGH}$	and $\frac{mIgL}{mIgL}$ $\frac{\Delta mIGH}{\Delta mIGH}$ $\frac{hIgL}{hIgL}$ $\frac{hIGH}{hIGH}$
XI.	Animal I X Animal IX				
	$\frac{\Delta mIgL}{mIgL}$	$\frac{mIGH}{mIGH}$	$\frac{hIgL}{hIgL}$	$\frac{hIGH}{hIGH}$	and $\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL}$ $\frac{mIGH}{mIGH}$ $\frac{hIgL}{hIgL}$ $\frac{hIGH}{hIGH}$

24 / 24

\*Not all possible genotypes from intercrosses are shown.

$\Delta$  = functionally inactive locus  
m = mouse endogenous gene  
h = human transgene  
IGH = immunoglobulin heavy chain  
IgL = immunoglobulin light chain

FIG. 18B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. application No.

PCT/US93/06926

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) :C12N 15/00

US CL :800/2

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 800/2

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, Dialog, "homologous recombination", ES cells, YACS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences, volume 86, issued August 1989, Traver <i>et al.</i> , "Rapid screening of a human genomic library in yeast artificial chromosomes for single-copy sequences", pages 5898-5902, see entire article.	1-11
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences, volume 87, issued July 1990, Pachnis <i>et al.</i> , "Transfer of a yeast artificial chromosome carrying human DNA from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> into mammalian cells", pages 5109-5113, see entire article.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
* A* document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	* X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
* E* earlier document published on or after the international filing date	* Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
* L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* G*	document member of the same patent family
* O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
* P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

13 SEPTEMBER 1993

Date of mailing of the international search report

21 OCT 1993

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Authorized officer

SUZANNE ZISKA



Facsimile No. NOT APPLICABLE

Telephone No. (703) 308-0196

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US93/06926

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nature, volume 338, issued 09 March 1989, Joyner <u>et al.</u> , "Production of a mutation in mouse En-2 gene by homologous recombination in embryonic stem cells", pages 153-156, see entire article.	1-11

THIS PAGE BLANK (OLDSP10)

BEST AVAILABLE COPY



Translation

ATENT COOPERATION TREA

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-681-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04518	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 23 August 1999 (23.08.99)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 21 August 1998 (21.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/027, C12N 5/10, 15/06		
Applicant KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 January 2000 (14.01.00)	Date of completion of this report 05 July 2000 (05.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04518

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-67,70-92	YES
	Claims	68-69	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-92	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-92	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations****(1) Claim 1**

Document 1: Smith, A. J. H. et al., Nature Genetics, Vol. 8, 1995, pages 376-385

Document 2: Dieken, E. S. et al., Nature Genetics, Vol. 12, 1996, pages 174-182

Document 1 discloses preparation of ES cells that retain modified chromosomes by marking a desired site by inserting a targeting vector prepared by homologous recombination of that desired site on a chromosome in an ES cell and inducing translocation at the marked site. Document 2 discloses the transfer of a foreign chromosome into a cell with a high homologous recombination efficiency by preparing a microcell that contains the foreign chromosome and fusing that microcell with the target cell, modifying the foreign chromosome by inserting a targeting vector prepared by homologous recombination on the desired site on the foreign chromosome in the cell with high homologous recombination efficiency, transferring the modified foreign chromosome to another cell, and investigating the function of the modified foreign chromosome.

Documents 1 and 2 both relate to the modification of chromosomes, and therefore, the invention described in the claim is obvious to persons skilled in the art if the homologous recombination described in document 1 is performed in cells with a high homologous recombination efficiency such as in the cells described in document 2.

Therefore, the invention described in this claim does not appear to involve an inventive step.

**(2) Claims 2-25**

See Item (1) above. The cells to be used and the site to be modified on the chromosome are matters that can be altered as needed by persons skilled in the art.

Therefore, the inventions described in these claims do not appear to involve an inventive step.

**(3) Claim 26**

Document 1: Smith A. J. H. et al., Nature Genetics, Vol. 8, 1995, pages 376-385

Document 2: Dieken E. S. et al., Nature Genetics, Vol. 12, 1996, pages 174-182

Document 1 discloses preparation of ES cells that retain modified chromosomes by marking a desired site by inserting a targeting vector prepared by homologous recombination of that desired site on a chromosome in an ES cell and inducing translocation at the marked site and it also discloses the preparation of a novel mouse from those ES cells. Document 2 discloses the transfer of a foreign chromosome into a cell with a high homologous recombination efficiency by preparing a microcell that contains the foreign chromosome and fusing that microcell with the target cell, modifying the foreign chromosome by inserting a targeting vector prepared by homologous recombination on the desired site on the foreign chromosome in the cell with high homologous recombination efficiency, transferring the modified foreign chromosome to another cell, and investigating the function of the modified foreign chromosome.

In consideration of the fact that documents 1 and 2 both relate to the modification of chromosomes and that the preparation of an animal from ES cells is well-known technology, the invention described in the claim is obvious to persons skilled in the art if the homologous recombination described in document 1 is performed in cells with a high homologous recombination efficiency such as in the cells described in document 2 and a non-human animal that retains the modified chromosome is obtained from ES cells that retain the modified chromosome.

Therefore, the inventions described in these claims do not appear to involve an inventive step.

**(4) Claims 27-45**



## Supplemental sheet of Box V. 2

## Continuation of Box V. 2

See Item (3) above. The animal to be used and the site to be modified on the chromosome are matters that can be altered as needed by persons skilled in the art.

Therefore, the inventions described in these claims do not appear to involve an inventive step.

## (5) Claim 46

Document 1: Smith A. J. H. et al., Nature Genetics, Vol. 8, 1995, pages 376-385

Document 2: Dieken E. S. et al., Nature Genetics, Vol. 12, 1996, pages 174-182

Document 1 discloses preparation of ES cells that retain modified chromosomes by marking a desired site by inserting a targeting vector prepared by homologous recombination of that desired site on a chromosome in an ES cell and inducing translocation at the marked site and it also discloses the preparation of a novel mouse from those ES cells. Document 2 discloses the transfer of a foreign chromosome into a cell with a high homologous recombination efficiency by preparing a microcell that contains the foreign chromosome and fusing that microcell with the target cell, modifying the foreign chromosome by inserting a targeting vector prepared by homologous recombination on the desired site on the foreign chromosome in the cell with high homologous recombination efficiency, transferring the modified foreign chromosome to another cell, and investigating the function of the modified foreign chromosome.

In consideration of the fact that documents 1 and 2 both relate to the modification of chromosomes, that the preparation of an animal from ES cells is well-known technology, and that obtaining an animal by transferring a desired cell nucleus to an unfertilized egg from which the nucleus has been removed is well-known technology (see, for example, S. M. Willadsen, Nature, Vol. 320, 1986, pages 63-65; Campbell et al., Nature, Vol. 380, 1996, pages 64-; Wilmut et al., Nature, Vol. 385, 1997, pages 810-), the invention described in the claim is obvious to persons skilled in the art if the homologous recombination described in document 1 is performed in cells with a high homologous recombination efficiency such as in the cells described in document 2 and a non-human animal that retains the modified chromosome is obtained from ES cells that retain the modified chromosome.

Therefore, the invention described in this claim does not appear to involve an inventive step.

## (6) Claims 47-67

See Item (5) above. The animal to be used and the site to be modified on the chromosome are matters that can be altered as needed by persons skilled in the art.

Therefore, the inventions described in these claims do not appear to involve an inventive step.

## (7) Claim 68

Document 3: Tomizuka K. et al., Nature Genetics, Vol. 16, 1997, pages 133-143

Document 4: WO, 97/07671, A1

Document 3 describes a mouse that retains a fragment of human chromosome 2. Therefore, the invention described in this claim does not appear to be novel.

Document 4 describes a mouse that retains a fragment of human chromosome 2, a mouse that retains a fragment of human chromosome 14, and a mouse that retains a fragment of human chromosome 22. Therefore, the invention described in this claim does not appear to be novel.

## (8) Claim 69

See Item (7) above. Which chromosome fragment is retained is a matter to be decided as needed by persons skilled in the art. Therefore, the invention described in this claim does not appear to be novel.

## (9) Claims 70-84

See Items (3) and (4) above. The inventions described in these claims do not appear to involve an inventive step.

## (10) Claims 85-92

See Items (1) and (2) above. The inventions described in these claims do not appear to involve an inventive step.





**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- (1) This examination finds that the description from page 8, line 15 to page 17 line 12 of the Specification, i.e., "The following is a summary of the invention...may be the same species or a different species," is supposed to be the invention described in the Claims, but this description does not match the description in the Claims.
- (2) This examination finds that the description from page 18, line 1 to page 26, line 24, i.e., "The further gist of this invention is as follows...chromosome fragment," does match the description in the Claims, but the meaning of the term "further gist" is unclear.



PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 21 JUL 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PH-681-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04518	国際出願日 (日.月.年) 23.08.99	優先日 (日.月.年) 21.08.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. 7 A01K 67/027, C12N 5/10, C12N 15/06		
出願人 (氏名又は名称) 麒麟麦酒株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。  
  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 14.01.00	国際予備審査報告を作成した日 05.07.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  長 井 啓 子	2B 9123
電話番号 03-3581-1101 内線 3236		



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
出願時に提出されたもの  
PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-67, 70-92 有  
請求の範囲 68, 69 無

進歩性(IS)

請求の範囲 有  
請求の範囲 1-92 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-92 有  
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

(1) 請求の範囲1について

文献1: Smith A. J. H. et al., Nature Genetics, vol. 8, p. 376-385 (1995)

文献2: Dieken E. S. et al., Nature Genetics, vol. 12, p. 174-182 (1996)

上記文献1には、ES細胞において染色体の所望の部位に相同組み換えによりターゲティングベクターを挿入することにより前記所望の部位にマーキングを施し、該マーキングを施した部位における転座を生ぜしめることによって、改変された染色体を保持するES細胞を作製することが、上記文献2には、外来染色体を含むマイクロセルを作製して該マイクロセルとの融合により相同組み換え効率の高い細胞へ前記外来染色体を移入させ、前記相同組み換え効率の高い細胞において前記外来染色体の所望の部位に相同組み換えによりターゲティングベクターを挿入することにより前記外来染色体を改変し、該改変された外来染色体を他の細胞に移入して該改変された外来染色体の機能を調べることが、それぞれ開示されている。

上記文献1及び文献2はいずれも染色体の改変に関するものであるので、上記文献1の染色体の相同組み換えを上記文献2に記載されたもののようにより相同組み換え効率の高い細胞中で行うことにより、本請求の範囲に記載された発明とすることは、当業者にとって自明なことである。

よって、本請求の範囲記載の発明は、進歩性を有しない。

(2) 請求の範囲2-25について

上記(1)を参照のこと。用いる細胞や染色体中の改変すべき部位等は、当業者が必要に応じて変更し得る程度のものである。

よって、本請求の範囲記載の発明は、進歩性を有しない。

(3) 請求の範囲26について

文献1: Smith A. J. H. et al., Nature Genetics, vol. 8, p. 376-385 (1995)

文献2: Dieken E. S. et al., Nature Genetics, vol. 12, p. 174-182 (1996)

上記文献1には、ES細胞において染色体の所望の部位に相同組み換えによりターゲティングベクターを挿入することにより前記所望の部位にマーキングを施し、該マーキングを施した部位における転座を生ぜしめることによって、改変された染色体を保持するES細胞を作製すること及び該ES細胞から新規なマウスが作出されるであろうことが、上記文献2には、外来染色体を含むマイクロセルを作製して該マイクロセルとの融合により相同組み換え効率の高い細胞へ前記外来染色体を移入させ、前記相同組み換え効率の高い細胞において前記外来染色体の所望の部位に相同組み換えによりターゲティングベクターを挿入することにより前記外来染色体を改変し、該改変された外来染色体を他の細胞に移入して該改変された外来染色体の機能を調べることが、





## Ⅶ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

- (1) 明細書第8頁第15行～第17頁第12行に「本発明の要旨は以下の通りである。・・・同種であっても異種であってもよい。」と、本願各請求の範囲記載の発明を認定しているが、本願特許請求の範囲の記載と整合していない。
- (2) 明細書第18頁第1行～第26頁第24行に「本発明のさらなる要旨は、以下の通りである。・・・染色体断片。」とあるが、こちらは本願特許請求の範囲の記載と整合しているが、「さらなる要旨」の意味するところが不明である。



補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

それぞれ開示されている。

上記文献 I 及び文献 2 はいずれも染色体の改変に関するものであること、及び ES 細胞から動物を作出することは周知技術であることを考慮すると、上記文献 I の染色体の相同組み換えを上記文献 2 に記載されたもののようにより相同組み換え効率の高い細胞中で行い、改変された染色体を保持する ES 細胞から改変された染色体を保持する非ヒト動物を得ることは、当業者にとって自明なことである。

よって、本請求の範囲記載の発明は、進歩性を有しない。

(4) 請求の範囲 27-45 について

上記 (3) を参照のこと。用いる動物や染色体中の改変すべき部位等は、当業者が必要に応じて変更し得る程度のものである。

よって、本請求の範囲記載の発明は、進歩性を有しない。

(5) 請求の範囲 46 について

文献 I : Smith A. J. H. et al., Nature Genetics, vol. 8, p. 376-385 (1995)

文献 2 : Dieken E. S. et al., Nature Genetics, vol. 12, p. 174-182 (1996)

上記文献 1 には、ES 細胞において染色体の所望の部位に相同組み換えによりターゲティングベクターを挿入することにより前記所望の部位にマーキングを施し、該マーキングを施した部位における転座を生ぜしめることによって、改変された染色体を保持する ES 細胞を作製すること及び該 ES 細胞から新規なマウスが作出されるであろうことが、上記文献 2 には、外来染色体を含むマイクロセルを作製して該マイクロセルとの融合により相同組み換え効率の高い細胞へ前記外来染色体を移入させ、前記相同組み換え効率の高い細胞において前記外来染色体の所望の部位に相同組み換えによりターゲティングベクターを挿入することにより前記外来染色体を改変し、該改変された外来染色体を他の細胞に移入して該改変された外来染色体の機能を調べることが、それぞれ開示されている。

上記文献 I 及び文献 2 はいずれも染色体の改変に関するものであること、ES 細胞から動物を作出することは周知技術であること、及び所望の細胞核を除核した未受精卵に移植して動物を得ることが周知技術であること (例えば、S. M. Willadsen, Nature, vol. 320, p. 63-65 (1986), Campbell et al., Nature, vol. 380, p. 64- (1996), Wilmut et al., Nature, vol. 385, p. 810- (1997) を参照) を考慮すると、上記文献 I の染色体の相同組み換えを上記文献 2 に記載されたもののようにより相同組み換え効率の高い細胞中で行い、改変された染色体を保持する ES 細胞から改変された染色体を保持する非ヒト動物を得ることは、当業者にとって自明なことである。

よって、本請求の範囲記載の発明は、進歩性を有しない。

(6) 請求の範囲 47-67 について

上記 (5) を参照のこと。用いる動物や染色体中の改変すべき部位等は、当業者が必要に応じて変更し得る程度のものである。

よって、本請求の範囲記載の発明は、進歩性を有しない。

(7) 請求の範囲 68 について

文献 3 : Tomizuka K. et al., Nature Genetics, vol. 16, p. 133-143 (1997)

文献 4 : WO, 97/07671, A1

上記文献 3 には、ヒト 2 番染色体断片を保持するマウスが記載されている。よって、本請求の範囲記載の発明は新規性を有しない。

また、上記文献 4 には、ヒト 2 番染色体断片を保持するマウス、ヒト 14 番染色体断片を保持するマウス及びヒト 22 番染色体断片を保持するマウスが記載されている。よって、本請求の範囲記載の発明は新規性を有しない。



1



2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000

2000 0000



補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

(8) 請求の範囲 69 について  
上記 (7) を参照のこと。どのような染色体断片を保持させるかは当業者が適宜変更しうる事項にすぎない。よって、本請求の範囲記載の発明は新規性を有しない。

(9) 請求の範囲 70 - 84 について  
上記 (3) 及び (4) を参照のこと。本請求の範囲記載の発明は進歩性を有しない。

(10) 請求の範囲 85 - 92 について  
上記 (1) 及び (2) を参照のこと。本請求の範囲記載の発明は進歩性を有しない。



•  
•  
•

|

(51) 国際特許分類6

A01K 67/027, C12N 5/10, 15/06

A1

(11) 国際公開番号

WO00/10383

(43) 国際公開日

2000年3月2日(02.03.00)

(21) 国際出願番号

PCT/JP99/04518

(22) 国際出願日

1999年8月23日(23.08.99)

(30) 優先権データ

特願平10/236169

1998年8月21日(21.08.98)

JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP]

〒104-8288 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者 ; および

(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)

富塚一磨(TOMIZUKA, Kazuma)[JP/JP]

吉田 均(YOSHIDA, Hitoshi)[JP/JP]

石田 功(ISHIDA, Isao)[JP/JP]

黒岩義巳(KUROIWA, Yoshimi)[JP/JP]

〒370-1295 群馬県高崎市宮原町3番地

麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma, (JP)

花岡和則(HANAOKA, Kazunori)[JP/JP]

〒228-8555 神奈川県相模原市北里1-15-1

北里大学理学部生物科学科内 Kanagawa, (JP)

押村光雄(OSHIMURA, Mitsuo)[JP/JP]

〒683-8503 鳥取県米子市西町86

鳥取大学医学部生命科学科内 Tottori, (JP)

(74) 代理人

平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.)

〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号

虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)

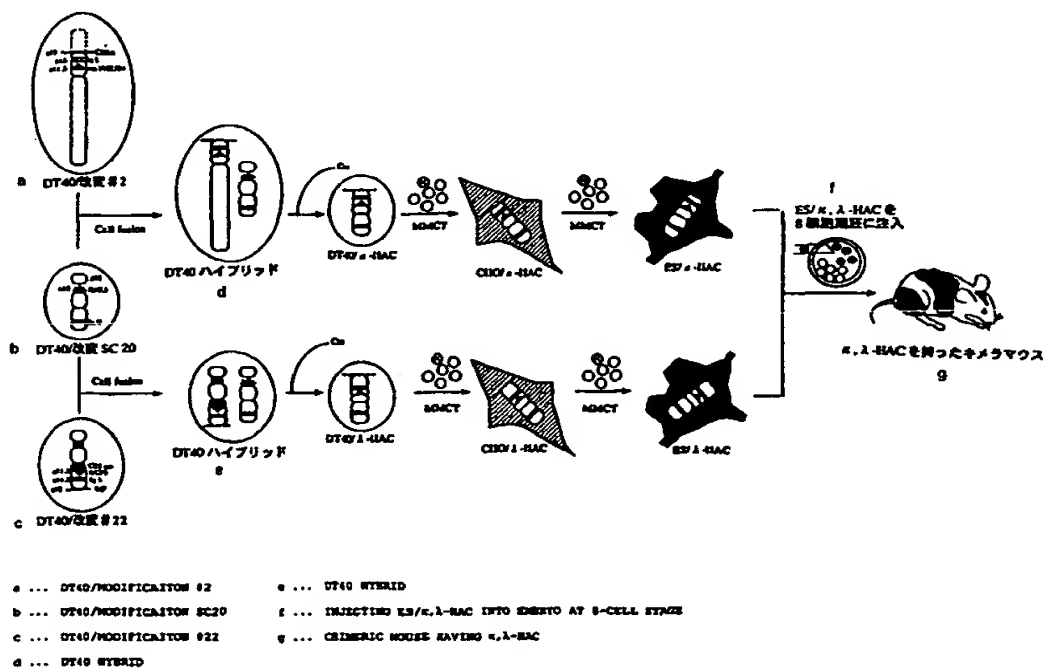
(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類

国際調査報告書

(54)Title: METHOD FOR MODIFYING CHROMOSOMES

(54)発明の名称 染色体の改変方法



(57) Abstract

A cell having a modified foreign chromosome (fragment) is constructed by transferring the foreign chromosome into a cell having a high homologous recombination efficiency by the microcell fusion method, marking a desired site of the foreign chromosome by the homologous recombination method, and inducing deletion and/or translocation at the marked site. A method for constructing a nonhuman animal having a modified foreign chromosome (fragment) by using the above procedure; and a modified animal, a recombinant chromosome (fragment) and an artificial chromosomal vector each obtained thereby.

ミクロセル融合法により外来染色体を相同組み換え効率の高い細胞に導入した後、相同組み換え法によって該外来染色体の所望の部位にマーキングを施し、該マーキング部位において欠失および／または転座を生ぜしめることによって、改変された外来染色体（断片）を保持する細胞を作製する。同様の手法により、改変された外来染色体（断片）を保持する非ヒト動物の作製方法、該動物、組み換え染色体（断片）、人工染色体ベクターも提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦  
AL アルバニア  
AM アルメニア  
AT オーストリア  
AU オーストラリア  
AZ アゼルバイジャン  
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
BY ベラルーシ  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コートジボアール  
CM カメルーン  
CN 中国  
CR コスタ・リカ  
CU キューバ  
CY キプロス  
CZ チェッコ  
DE ドイツ  
DK デンマーク

DM ドミニカ  
EE エストニア  
ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GB 英国  
GD グレナダ  
GE グルジア  
GH ガーナ  
GM ガンビア  
GN ギニア  
GW ギニア・ビサオ  
GR ギリシャ  
HR クロアチア  
HU ハンガリー  
ID インドネシア  
IE アイルランド  
IL イスラエル  
IN インド  
IS アイスランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KE ケニア  
KG キルギスタン  
KP 北朝鮮  
KR 韓国

KZ カザフスタン  
LC セントルシア  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリ・ランカ  
LR リベリア  
LS レソト  
LT リトアニア  
LU ルクセンブルグ  
LV ラトヴィア  
MA モロッコ  
MC モナコ  
MD モルドヴァ  
MG マダガスカル  
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア  
共和国  
ML マリ  
MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
MX メキシコ  
NE ニジェール  
NL オランダ  
NO ノールウェー  
NZ ニュー・ジーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア

RU ロシア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SG シンガポール  
SI スロヴェニア  
SK スロヴァキア  
SL シエラ・レオネ  
SN セネガル  
SZ スワジランド  
TD チャード  
TG トーゴ  
TJ タジキスタン  
TZ タンザニア  
TM トルクメニスタン  
TR トルコ  
TT トリニダード・トバゴ  
UA ウクライナ  
UG ウガンダ  
US 米国  
UZ ウズベキスタン  
VN ヴィエトナム  
YU ユーゴスラビア  
ZA 南アフリカ共和国  
ZW ジンバブエ



## 明 細 書

## 染色体の改変方法

## 技術分野

本発明は染色体あるいはその断片の改変方法に関する。

また、本発明は、キメラ非ヒト動物、その作製法およびその利用法に関する。本発明のキメラ非ヒト動物を用いれば、これまで不可能であった1Mb（百万塩基対）以上の外来巨大DNA断片を動物個体で保持発現させることが可能になる。従って、これを利用することにより、

・生物学的に活性な物質をコードする遺伝子の全長、例えば、ヒト抗体遺伝子全長を保持し、発現する動物個体の作製が可能になる。この動物から得られる生物学的に活性な物質、例えば、ヒト抗体は医薬品としての利用価値がある。

・ヒト巨大遺伝子（組織適合性抗原、ジストロフィン等）の動物個体における機能解析が可能になる。

・ヒト優性遺伝病及び染色体異常症のモデル動物作製に利用できる。

また、本発明は、内因性遺伝子が破壊されている分化多能性保持細胞およびその使用、ならびにミクロセル法を用いたキメラ動物の作製法および該キメラ動物の使用に関する。破壊された内因性遺伝子と同じまたは相同の遺伝子産物をコードする遺伝子を含む外来染色体またはその断片を受容細胞としての本発明の細胞に移入させて、その細胞から目的とする機能細胞やキメラ非ヒト動物を作製すれば、分化多能性細胞を生殖系列細胞へ分化させなくとも、導入遺伝子を効率良く発現させることが可能になる。これは内因性遺伝子の破壊あるいは導入遺伝子によって、非ヒト動物の生殖細胞に影響を与えるかあるいは生殖細胞への分化を不可能にするような場合にも、分化多能性細胞から目的とする機能細胞や非ヒト動物を作製することによって、内因性遺伝子を欠損し内因性遺伝子産物を低減した状態で、これまで不可能であった1Mb（百万塩基）を超える外来巨大DNA断片をかける機能細胞やキメラ非ヒト動物の個体、組織または細胞において保持発現させることが可能になる。

## 背景技術

外来遺伝子を動物個体において発現させる技術、すなわちトランスジェニック動物作製技術は、その遺伝子の生体内機能に関する情報を得るために有用なばかりでなく、遺伝子発現を制御するDNA配列の同定（例えば、Magramら, *Nature*, 315:338, 1985）、ヒト疾患モデル動物の開発（山村ら, マニュアル疾患モデルマウス, 中山書店, 1994）、さらには家畜の育種（例えば、Mullerら, *Experientia*, 47:923, 1991）、それを用いた有用物質の生産に利用されてきた（例えば、Velandarら, *P.N.A.S.*, 89:12003, 1992）。遺伝子導入の対象としてはこれまでマウスが最も多く用いられてきた。実験動物として詳細に研究され、胚操作技術も確立されているマウスはこの目的に最も適した哺乳動物であるといえる。

マウス個体への外来遺伝子導入法は大きく分けて2つ知られている。1つは受精卵前核にDNAを注入する方法（Gordonら, *P.N.A.S.*, 77:7380, 1980）であり、もう一つは分化全能性を保持した胚幹細胞（以下ES細胞、という）にDNAを導入し、キメラマウスを作製する方法（Takahashiら, *Development*, 102:259, 1988）である。後者の場合、キメラマウスにおいては、ES細胞の貢献した細胞、組織においてのみ、ES細胞由来の生殖細胞を経て得られる子孫においてはすべての細胞、組織で導入遺伝子が保持される。これらの技術を利用して現在までに数多くのトランスジェニックマウスが作製されてきた。

しかし、現状では導入可能なDNAの大きさに限界があり、それがこの技術の利用範囲を大きく制限している。その限界はクローン化可能なDNAの大きさに依存し、これまで最も大きなDNA断片を導入した例の一つは、酵母人工染色体（YAC）にクローニングされた約670kbのDNA断片である（Jakobovitsら, *Nature*, 362:255, 1993）。さらに最近になってヒト抗体重鎖遺伝子の可変領域の約8割及び定常領域の一部（ $C\mu$ 、 $C\delta$ 、 $C\gamma 2$ ）を含む約1MbのYACの導入も報告された（Mendezら, *Nature Genetics*, 15:146, 1997）。これらの実験は、YACを保持する酵母とマウスES細胞を融合することにより行なわれた。YACにおいては、約2Mbまでの外来DNAをクローニングできるとされているが（Den Dunnenら, *Hum. Mol. Genet.*, 1:19, 1992）、出芽酵母細胞中では、相同DNA配列同士の組換え頻度

が高いことが知られており、反復配列を多く有するヒトDNA断片を完全な形で安定に保持することが困難な場合がある。事実、ヒトゲノムDNAを含むYACライブラリーでは、その20～40%が何らかの組換えを起こしている（Greenら、Genomics, 11:584, 1991）。

もう1つの方法として、ヒト培養細胞から得られる中期染色体を顕微切断し、その断片（10Mb以上と推定される）をマウス受精卵に注入することが試みられた（Richaら、Science, 245:175, 1989）。この結果得られたマウス個体においてヒト特異的DNA配列（Alu 配列）が検出されたが、ヒト遺伝子発現については確認されていない。また、ここで用いられた染色体調製法では染色体をスライドグラスに固定する際、酢酸メタノールを使用するために、DNA自体が小さく断片化してしまうことが避けられず、注入したDNAが一続きのDNAとして存在している可能性は低い。

いずれにせよ、現在まで1Mbを超える一続きの外来DNA断片をマウス個体へ導入、発現させた例はないといえる。

マウスに導入することが望まれる、有用かつ興味深いヒト遺伝子：抗体（例えば、Cookら、Nature Genetics, 7:162, 1994）、T細胞受容体（Hoodら、Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. LVIII, 339, 1993）、組織適合性抗原（Carrollら、P.N.A.S., 84:8535, 1987）、ジストロフィン（Dunnenら、前記）等は、そのコード領域自体が1Mbを超える大きさを持つことが知られている。とりわけ、ヒト型抗体の医薬品としての重要性から、ヒトの免疫グロブリン重鎖（～1.5Mb、Cookら、前記）、軽鎖 $\kappa$ （～3Mb、Zachau, Gene, 135:167, 1993）、軽鎖 $\lambda$ （～1.5Mb、Frippiatら、Hum. Mol. Genet., 4:983, 1995）の遺伝子全長を保持し、発現するようなマウスの作製が望まれているがそれは現状の技術では不可能である（日経バイオテク, 1993.7.5.）。

また、ヒトの優性遺伝疾患、先天異常を引き起こす染色体異常症（ダウン症等）の原因遺伝子の多くはクローン化されておらず、染色体上の大まかな位置情報のみ利用可能である。例えば、中期染色体をギムザ染色することによって得られるGバンドは、通常数Mb～10Mb以上の大きさを有している。従って、ある原因遺伝子が特定のGバンド上に存在することが明らかとなっても、これらの異常形

WU 00/10585  
質をマウスに導入するためには、原因遺伝子周辺の染色体断片（数Mb以上）を導入することが必要であるが、これも現状の技術では不可能である。

ここに従来技術の限界である1Mbを超える外来DNAをマウス個体に導入し、発現させる技術の開発が望まれている。

動物培養細胞においては、従来技術により上述の限界を越える大きさのDNAを導入することが可能である。これは主に、染色体（ヒトの場合約50～300Mbの大きさを持つ）を媒体として行なわれる。細胞への染色体移入法はいくつか報告されているが（例えば、McBrideら, P.N.A.S., 70:1258, 1973）、その中でも望みの染色体を1本だけ導入する方法として最適と考えられているのがマイクロセル法である（Koiら, Jpn. J. Cancer Res., 80:413, 1989）。マイクロセルと呼ばれる構造体は1本～数本の染色体が核膜、形質膜に包まれたものである、ある種の細胞において紡垂体形成を阻害する薬剤により誘導されるマイクロセルを分離し、受容細胞と融合することにより、少数（多くの場合は1本）の染色体を導入することが可能である。この方法により得られた、ヒト染色体を1本だけ保持するモノクロモソーム雑種細胞のライブラリーは既知遺伝子のマッピングや、未知の癌抑制遺伝子、細胞老化遺伝子等の存在する染色体を特定するために利用されてきた（例えば、Saxonら, EMBO J., 5:3461, 1986）。さらに、マイクロセルにガンマ線を照射することにより、染色体を断片化しその一部を導入することも可能である（Koiら, Science, 260:361, 1993）。すなわち、マイクロセル法は、1Mbを超えるDNAを動物培養細胞に導入する方法として適していると考えられる。

培養細胞からマウス個体を作り出すことができないかという期待は、分化全能性を安定に保持するES細胞の発見（Evansら, Nature, 292:154, 1981）により確実に現実のものとなった。このES細胞には外来遺伝子、種々の突然変異、さらには、標的遺伝子組換えによる変異が導入可能となり、マウス個体レベルの遺伝的改変が自在に行なえるようになった（例えば、Mansourら, Nature, 336:348, 1988）。このようなES細胞で、ジーンターゲットイングによって標的遺伝子を破壊したマウスを作製し、目的遺伝子を導入したトランスジェニックマウスとを交配させ、目的遺伝子を効率良く発現するマウスを作製することができる。例えば、マウスの抗体遺伝子を破壊したマウスとヒト抗体遺伝子を導入したマウスを交配

させ、ヒト抗体遺伝子を効率良く発現させることができる。正常二倍体細胞には対立遺伝子（アレル）が存在する。マウスの片側のアレルの抗体重鎖遺伝子を破壊したトランスジェニックマウスでは、マウス血清中のヒト抗体濃度が上昇し、さらに交配によって両側のアレルとも破壊したマウスではさらにヒト抗体濃度が顕著に上昇する（S.D.Wagnerら、Genomics, 35:405-414, 1996）。

また片側のアレルの標的遺伝子を破壊した後、選択薬剤を高濃度にし、両側のアレルとも標的遺伝子を欠損させること（ダブルノックアウト）も行われてきた。しかし高濃度選択培養法で得られた標的遺伝子欠損細胞はin vivoでの培養が長期にわたること、薬剤による選択圧がきついことなどの理由から生殖細胞への分化能が低下しているおそれがあった（高津・瀧、実験医学別冊 バイオマニュアルUPシリーズ 免疫研究の基礎技術、羊土社、1995）。あるいは、2種類の選択薬剤、例えばネオマイシン耐性細胞に対してハイグロマイシンを用いてダブルノックアウトをした場合には、その二重耐性ES細胞が変異マウスとなる例は少ない（渡部ら、組織培養21、42-45、1995）。また、ES細胞は培養条件によって分化能や増殖能を失うおそれがあり、2回のジーンターゲッティングではキメラマウスの生殖細胞への分化能を失わないが、第2段階の相同組換え頻度が極めて低いなどから（勝木ら、実験医学 Vol.11 No.20 増刊 1993）、標的遺伝子欠損ホモ接合体を得る場合、とりわけ標的遺伝子が2つ以上の場合には、それぞれの標的遺伝子をヘテロ欠損させたマウスを作製したのち交配して2つ以上の遺伝子をホモに欠損したマウスを作製することが多かった（N. Longberg ら、Nature, 368:856-859, 1994）。破壊すべき遺伝子が近接して存在し、交配によって2つ以上の遺伝子を欠損したマウスが得られない場合には、ES細胞において、2つの標的遺伝子をヘテロに欠損させたマウスを作製し、交配によってホモ欠損マウスを作製することが行われてきた（J.H. van Reeら、Hum Mol Genet 4:1403-1409, 1995）。

分化多能性を持つES細胞を、in vitroで機能細胞に分化させることが試みられている（T. Nakano ら、Science, 265:1098-1101, 1994, A.J. Potocnik ら、The EMBO Journal, 13:5274-5283, 1994）。このような培養システム、例えば成熟B細胞まで分化を誘導できるシステムは、B細胞の発生・分化過程において機能

する未知の増殖・分化因子の同定への利用が期待されている。

一方、巨大DNAの導入という意味では前述のYACベクターにクローニング可能な外来DNA断片の大きさが限界と考えられてきた。その大きさを越えるDNAを培養細胞に導入可能な染色体移入という従来技術がマウス個体レベルへの遺伝子導入に利用されたことはなく、またその達成は困難であると考えられてきた（村松ら、トランスジェニックバイオロジー、講談社サイエンティフィク、p143-, 1989）。理由としては、以下のようなものが挙げられる。

- ・ 受容細胞を正常核型のマウスES細胞としてこれにヒト染色体導入を行なう場合、それは染色体異常そのものを導入することである。これまで、顕微鏡によって識別可能な染色体レベルの大きな遺伝子異常はマウスの発生にとって多くの場合致死的であると考えられてきた（Groppら、J.Exp.Zool., 228:253, 1983; 相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲティング、羊土社、1995）。

- ・ 我々が得ることのできるヒト染色体は通常、有限増殖の正常繊維芽細胞、あるいは癌細胞等の分化した体細胞のものであり、そのような体細胞由来の染色体が未分化なES細胞に導入された場合、ES細胞を分化させたり（Mullerら、Nature, 311:438, 1984）、老化させてしまうのではないかと（Sugawara, Science, 247:707, 1990）と考えられた。

- ・ 体細胞由来の染色体が初期胚に導入された場合、胚発生過程で生殖細胞由来のそれと同様に正しく機能し、多様な組織、細胞における特異的遺伝子発現を担うことができるかという問題についての研究は非常に少ない。この2者における大きな違いの一つは染色体DNAのメチル化状態と想像される。これは細胞の分化に伴って変化し、組織特異的な遺伝子発現における重要な役割が示唆されている（Ceder, Cell, 53:3, 1988）。例えば、抗体遺伝子の活性化に不可欠な部位特異的DNA組換え反応について、メチル化した基質をB細胞に導入した場合、メチル化の状態は複製後も保持され、組換え反応を阻害するという報告がある（Hsiehら、EMBO J., 11:315, 1992）。また、株化された細胞中では生体内と比較して、de novoのメチル化が起こりやすいとされている（Antequeraら、Cell, 62:503, 1990）。よってこれまでの研究から、繊維芽細胞や、ヒトーマウス雑種細胞のおそらく高度にメチル化されているであろう抗体遺伝子がマウスのB細胞で正常に

発現すると想像することは容易ではなかった。

ここで、関連するものとしてIllmenseeらの2つの報告（P.N.A.S., 75:1914, 1978; P.N.A.S., 76: 879, 1979）に注目しなければならない。1つはヒト肉腫細胞とマウスEC細胞、もう1つはラット肝癌細胞とマウスEC細胞の全細胞融合により得られた融合株からキメラマウスを作製したという報告である。これらの報告においてはその実験結果に数多くの疑問点が指摘され、その信憑性は低いと考えられている（野口ら、マウスのテラトーマ、理工学社、5節、1987）。また、1日も早い追試が望まれていたにも関わらず、報告から18年を経た現在までこの実験を再現できたという報告は存在しない。従って、これらの報告によつては、マウス個体において外来染色体を保持させ、該染色体上の遺伝子を発現させ得たということとはできないと考えられてきた。

こうした状況において、染色体断片ほどの巨大DNAをマウスをはじめとする動物個体に導入し、発現させることは困難とされ、実際この問題について検討がなされたことは上記のIllmenseeらの報告以来ない。

従って、本発明は、外来染色体またはその断片を保持し、該染色体またはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物およびその子孫、並びに前記のキメラ非ヒト動物の作製法を提供することを目的とする。

また、本発明は、前記のキメラ非ヒト動物およびその子孫に由来する組織および細胞を提供することを目的とする。

さらに、本発明は、前記のキメラ非ヒト動物およびその子孫に由来する細胞とミエローマ細胞との融合により作製されたハイブリドーマを提供することも目的とする。

さらにまた、本発明は、非ヒト動物の個体、組織または細胞を用いて、外来染色体またはその断片上の遺伝子の発現産物である生物学的に活性な物質を製造する方法を提供することを目的とする。

また、本発明は、外来染色体またはその断片を保持し、該染色体またはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物を作製するにあたって、外来染色体またはその断片を移入させる受容細胞として利用可能な分化多能性を保持する細胞を提供することを目的とする。

また、本発明は、前記の分化多能性を保持する細胞の利用方法を提供することも目的とする。

さらに、本発明は、染色体あるいはその断片の改変方法を提供することも目的とする。

#### 発明の開示

発明者らは前記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、ヒト正常繊維芽細胞由来染色体あるいはその部分断片をマイクロセル法によりマウスES細胞に導入し、それを安定に保持する株を得ることに成功した。さらにこのES細胞株から、その正常組織においてヒト染色体を保持し、ヒト抗体重鎖遺伝子を含む複数のヒト遺伝子を発現するキメラマウスを得た。我々はこの一連の方法により、これまで不可能であった巨大DNA断片の個体における保持、及び該DNA断片上の遺伝子の発現を可能にした。さらに、発明者らは、抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子が共にノックアウトされた胚性幹細胞を得ることに成功した。また、発明者らは、染色体を人為的に改変する新たな方法も開発した。

本発明の要旨は以下の通りである。

1. 単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、分化多能性を保持する細胞へ前記単一または複数の外来染色体あるいはその断片を移入させることを特徴とする、キメラ非ヒト動物の作製法。
2. 単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、分化多能性を保持する細胞へ前記単一または複数の外来染色体あるいはその断片を移入させることを特徴とする、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む分化多能性を保持する細胞の作製方法。

1 または 2 の方法においては、単一または複数の外来染色体あるいはその断片が 670 kb を越えてもよく、さらに、1 Mb (百万塩基対) 以上であってもよい。外来染色体あるいはその断片は抗体をコードする領域を含むものであってもよい。単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルは、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む細胞とマイクロセル形成能の高い



細胞とを融合させて作製されたハイブリッド細胞から誘導されたものであってもよい。さらに、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルは、前記ハイブリッド細胞から誘導されたマイクロセルをさらにマイクロセル形成能の高い細胞と融合させて作製された細胞から誘導されたものであってもよい。単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む細胞はヒト正常2倍体細胞であってよい。マイクロセル形成能の高い細胞はマウスA9細胞であってよい。分化多能性を保持する細胞は、胚性癌腫細胞、胚性幹細胞、胚性生殖細胞およびそれらの変異体から成る群より選択することができる。外来染色体あるいはその断片が目的の遺伝子を含むものであり、分化多能性を保持する細胞がその外来染色体あるいはその断片上の該目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されているとよい。外来染色体あるいはその断片が少なくとも2種の目的の遺伝子を含むものであり、分化多能性を保持する細胞がその外来染色体あるいはその断片上の該目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されていてもよい。分化多能性を保持する細胞において、前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子の両側または片側の対立遺伝子が破壊されているとよい。目的の遺伝子は抗体遺伝子であってよい。抗体遺伝子は抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子であってよい。1および2の方法においては、外来染色体あるいはその断片が目的の遺伝子を含むものであり、その外来染色体あるいはその断片上の前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞に、該目的の遺伝子を含む外来染色体あるいはその断片を移入した後、該細胞と前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物の胚とのキメラを作製してもよい。前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物が標的遺伝子相同組み換え法により作製することができる。キメラ非ヒト動物は、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現し、該外来染色体あるいはその断片を子孫に伝達可能なものであるとよい。キメラ非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはマウスである。

3. 単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む分化多能性を保持する

単一または複数の外来染色体あるいはその断片は670 kbを越えてもよい。

3の細胞においては、外来染色体あるいはその断片が目的の遺伝子を含むものであり、分化多能性を保持する細胞においてはその外来染色体あるいはその断片上の該目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されていてもよい。

また、外来染色体あるいはその断片が少なくとも2種の目的の遺伝子を含むものであり、分化多能性を保持する細胞においてはその外来染色体あるいはその断片上の該目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されていてもよい。

さらに、分化多能性を保持する細胞において、前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子の両側または片側の対立遺伝子が破壊されているとよい。外来染色体あるいはその断片は抗体遺伝子を含んでもよい。抗体遺伝子は抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子であってもよい。分化多能性を保持する細胞は、胚性癌腫細胞、胚性幹細胞、胚性生殖細胞およびそれらの変異体から成る群より選択することができる。3の細胞は、キメラ非ヒト動物を作製するために使用することができる。

4. 単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物、または、前記の単一もしくは複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するその子孫。

単一または複数の外来染色体あるいはその断片は670 kbを越えてもよい。

外来染色体あるいはその断片が目的の遺伝子を含むものであり、該目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されていてもよい。外来染色体あるいはその断片が少なくとも2種の目的の遺伝子を含むものであり、該目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されていてもよい。前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子の両側または片側の対立遺伝子が破壊されていてもよい。前記目的の遺伝子は抗体遺伝子であってもよい。抗体遺伝子は抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子であってもよい。

5. 4のキメラ非ヒト動物またはその子孫の交配により得られる単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺

伝子を発現する非ヒト動物、または、単一もしくは複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するその子孫。

6. 単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現する4のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または5の非ヒト動物もしくはその子孫を、該遺伝子と同じあるいは相同の遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物と交配させることにより作製された非ヒト動物、または、前記の単一もしくは複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するその子孫。

7. 4のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫、5の非ヒト動物もしくはその子孫、または6の非ヒト動物もしくはその子孫に由来する組織。

8. 4のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫、5の非ヒト動物もしくはその子孫、または6の非ヒト動物もしくはその子孫に由来する細胞。

細胞は、B細胞であってもよいし、動物の組織由来の初代培養細胞あるいは株化細胞との融合細胞であってもよい。

9. 上記のB細胞とミエローマ細胞との融合により作製されたハイブリドーマ。

10. 4のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫、5の非ヒト動物もしくはその子孫、または6の非ヒト動物もしくはその子孫の個体、組織または細胞において、単一または複数の外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現させ、その産物としての生物学的に活性な物質を回収することを特徴とする、生物学的に活性な物質の製造法。

キメラ非ヒト動物の細胞はB細胞であってもよい。B細胞はミエローマ細胞と融合して、不死化されていてもよい。また、キメラ非ヒト動物の細胞は、動物の組織由来の初代培養細胞あるいは株化細胞との融合細胞であってもよい。生物学的に活性な物質は抗体であってもよい。抗体は、好ましくは哺乳動物の抗体であり、より好ましくはヒト抗体である。

11. 10の方法により製造できる生物学的に活性な物質。

12. 670 kb を越えるヒト抗体遺伝子の少なくとも一つを保持し、発現する非ヒト動物。

12の非ヒト動物は、1 Mb 以上のヒト抗体遺伝子の少なくとも一つを保持し、

発現するとよい。ヒト抗体遺伝子は、ヒト重鎖遺伝子、ヒト軽鎖 $\kappa$ 遺伝子、ヒト軽鎖 $\lambda$ 遺伝子またはそれらの組み合わせであってもよい。さらに、12の非ヒト動物においては、そのヒト抗体遺伝子と同じあるいは相同の非ヒト動物抗体遺伝子が欠損しているとよい。そのヒト抗体遺伝子と同じあるいは相同の非ヒト動物抗体遺伝子の欠損は、遺伝子相同組換えによる該非ヒト動物抗体遺伝子の破壊によるものであってもよい。

13. 12の非ヒト動物の脾臓細胞とミエローマ細胞との融合により得られるハイブリドーマ。

14. 13のハイブリドーマにより産生される抗体。

15. ヒト抗体の少なくとも一つのクラスまたはサブクラスを発現する非ヒト動物。

15の非ヒト動物においては、発現するヒト抗体のクラスまたはサブクラスの遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が欠損していてもよい。ヒト抗体のクラスまたはサブクラスは、IgM、IgG、IgE、IgA、IgDおよびそれらのサブクラス、またはそれらの組み合わせであってもよい。

16. 670 kbを越える単一または複数の外来DNAを保持し、該外来DNA上の遺伝子が発現する非ヒト動物。

16の非ヒト動物においては、発現する外来DNA上の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が欠損していてもよい。16の非ヒト動物は、1 Mb以上の単一または複数の外来DNAを保持し、該外来DNA上の遺伝子が発現してもよい。発現する外来DNA上の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子は欠損していてもよい。

17. 単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むミクロセルを作製し、該ミクロセルとの融合により、前記単一または複数の外来染色体あるいはその断片を胚盤胞に由来する培養細胞へ移入し、該細胞の核を除核した未受精卵に移植することを特徴とする、トランスジェニック非ヒト動物の作製法。

18. 少なくとも2種の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞。

18の細胞においては、少なくとも2種の内因性遺伝子の両側または片側の対立遺伝子が破壊されていてもよい。破壊されている内因性遺伝子は抗体遺伝子であってもよい。破壊されている抗体遺伝子は抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子

であってもよい、分化多能性を保持する細胞は、胚性癌腫細胞、胚性幹細胞、胚性生殖細胞およびそれらの変異体から成る群より選択することができる。

19. 少なくとも2回の相同組換えにより、18の細胞を作製する方法。

19の方法においては、薬剤耐性マーカー遺伝子を用いる相同組換えにより分化多能性を保持する細胞の内因性遺伝子の片側の対立遺伝子を破壊し、該細胞を該薬剤の存在下で培養し、薬剤耐性となった株を選択し、これらの株をスクリーニングすることにより内因性遺伝子の両側の対立遺伝子が破壊された株を得る工程を含んでもよい。薬剤耐性マーカー遺伝子を用いる相同組換えにより分化多能性を保持する細胞の内因性遺伝子の片側の対立遺伝子を破壊し、さらに内因性遺伝子の他方の側の対立遺伝子も薬剤耐性マーカー遺伝子を用いる相同組換えにより破壊してもよい。内因性遺伝子の片側の対立遺伝子を破壊するための相同組換えに用いる薬剤耐性マーカー遺伝子が、他方の側の対立遺伝子を破壊するための相同組換えに用いる薬剤耐性マーカー遺伝子と同じ種類であってもよい。内因性遺伝子の片側の対立遺伝子を破壊するための相同組換えに用いる薬剤耐性マーカー遺伝子が、他方の側の対立遺伝子を破壊するための相同組換えに用いる薬剤耐性マーカー遺伝子と異なる種類であってもよい。

また、本発明は、単一または複数の外来遺伝子あるいはその断片ないしは単一または複数の外来染色体あるいはその断片を移入させる受容細胞としての、前記の分化多能性を保持する細胞の利用方法を提供する。単一または複数の外来遺伝子あるいはその断片は、プラスミド、コスミド、YAC等のベクターに組み込まれていてもよく、単一または複数の外来染色体あるいはその断片はミクロセルに含まれていてもよい。移入させる単一または複数の外来染色体あるいはその断片は、分化多能性を保持する細胞において破壊されている内因性遺伝子と同じまたは相同の遺伝子を含むものであるとよいが、特に限定されるものではない。本明細書において、「相同の遺伝子」とは、生物種間または種内において、同種または近似の性質を持つタンパク質をコードする遺伝子をいうものとする。

さらに、本発明は、キメラ非ヒト動物を作製するための、前記の分化多能性を保持する細胞の利用方法を提供する。

さらにまた、本発明は、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む

マイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記の少なくとも2種の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞へ前記単一または複数の外来染色体あるいはその断片を移入させることを特徴とする、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む分化多能性を保持する細胞の作製方法、および単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記の少なくとも2種の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞へ前記単一または複数の外来染色体あるいはその断片を移入させることを特徴とする、キメラ非ヒト動物の作製法を提供する。単一または複数の外来染色体あるいはその断片は1 Mb（百万塩基）を超える大きさを有するものであってもよい。外来染色体あるいはその断片は抗体をコードする領域を含むものであってもよい。単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルは、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む細胞とマイクロセル形成能の高い細胞とを融合させて作製されたハイブリッド細胞から誘導されてもよい。また、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルは、前記ハイブリッド細胞から誘導されたマイクロセルをさらにマイクロセル形成能の高い細胞と融合させて作製された細胞から誘導されたものであってもよい。単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む細胞はヒト正常2倍体細胞であってもよい。マイクロセル形成能の高い細胞はマウスA9細胞であってもよい。上記のキメラ非ヒト動物の作製法においては、少なくとも2種の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞に、該細胞において破壊されている内因性遺伝子と同じあるいは相同の遺伝子を含む外来染色体あるいはその断片を移入した後、該細胞と前記内因性遺伝子と同じあるいは相同の遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物の胚とのキメラを作製してもよい。少なくとも2種の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞において破壊されている内因性遺伝子と同じあるいは相同の遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物は、標的遺伝子相同組み換え法により作製されたものであってもよい。キメラ非ヒト動物は、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現し、該外来染色体あるいはその断片を子孫に伝達可能なものであるとよい。キメラ非ヒト動物は哺乳動物であるとよ

く、より好ましくは、マウスである。

また、本発明は、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むミクロセルを作製し、該ミクロセルとの融合により、前記の少なくとも2種の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞へ前記単一または複数の外来染色体あるいはその断片を移入させることを特徴とする、キメラ非ヒト動物の作製法により作製することができ、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む分化多能性を保持する細胞を提供する。本発明は、さらに、キメラ非ヒト動物を作製するための上記細胞の利用方法も提供する。

本発明は、上記のキメラ非ヒト動物の作製法により作製することができ、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物、または、前記の単一もしくは複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するその子孫を提供する。また、本発明は、上記のキメラ非ヒト動物またはその子孫の交配により得られる単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現する非ヒト動物、または、単一もしくは複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するその子孫を提供する。さらに、本発明は、上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫に由来する組織および細胞を提供する。この細胞はB細胞であってもよい。

また、本発明は、上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫に由来する細胞とミエローマ細胞との融合により作製されたハイブリドーマを提供する。

本発明は、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現する上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または上記の非ヒト動物もしくはその子孫を、該遺伝子と同じあるいは相同の遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物と交配させることにより作製された非ヒト動物、または、前記の単一もしくは複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するその子孫を提供する。

さらに、本発明は、上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫の個体、組織または細胞において、単一または複数の外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現させ、その産物としての生物学的に活性な物質を回収することを特徴とする、生物学的に活性な物質の製造法を提供する。上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫の細胞はB細胞であってもよい。B細胞はミエローマ細胞と融合して、不死化されていてもよい。生物学的に活性な物質は抗体であってもよく、抗体は哺乳動物の抗体であるとよく、より好ましくは、ヒト抗体である。

さらにまた、本発明は、上記の単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫を、該遺伝子と同じあるいは相同の遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物と交配させ、誕生した子動物の個体、組織または細胞において、前記の単一または複数の外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現させ、その産物としての生物学的に活性な物質を回収することを特徴とする、生物学的に活性な物質の製造法を提供する。

本発明はまた、外来染色体からなる非ヒト動物及び非ヒト動物細胞への遺伝子導入用ベクターを提供する。外来染色体は、好ましくはヒトに由来するものであり、より好ましくはヒト14番染色体断片である。非ヒト動物は、好ましくはマウスである。

本明細書においては、対立遺伝子 (allele) を以下「アレル」ということとする。

また、本明細書において、「相同の遺伝子」とは、生物種間または種内において、同種または近似の性質を持つタンパク質をコードする遺伝子をいうものとする。

ここで、「外来染色体」とは、対象とする細胞にとって外部から導入される染色体を意味する。例えば、改変された外来染色体あるいはその断片を保持する細胞を作製する場合には、染色体改変の場となる細胞（例えば、ニワトリDT-40細胞のような相同組換え効率の高い細胞）にとって外部から導入される染色体が外来染色体である。また、改変された外来染色体あるいはその断片を保持するキメ



ラ非ヒト動物を作製する場合には、上記の染色体改変の場となる細胞の他、改変した染色体を移入させる分化多能性を保持する非ヒト動物細胞（例えば、ES細胞）にとって外部から導入される染色体が外来染色体である。あるいはまた、改変された外来染色体あるいはその断片を保持する非ヒト動物を作製する場合には、上記の染色体改変の場となる細胞の他、改変した染色体を移入させる非ヒト動物由来の細胞（例えば、胚、胚盤胞、胎児または成体由来の培養細胞や胎児由来の繊維芽細胞）にとって外部から導入される染色体が外来染色体である。本発明によれば、外来染色体またはその断片を移入させた分化多能性を保持する細胞から作製したキメラ非ヒト動物または非ヒト動物において、該染色体またはその断片上の遺伝子を発現させることができる。対象とする細胞が由来する生物種および外来染色体が由来する生物種は特に限定されず、両者は、同種であっても異種であってもよい。

本発明のさらなる要旨は、以下の通りである。

1. 改変された外来染色体あるいはその断片を保持する細胞の作製方法であって、下記の工程：

(a) 外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により相同組換え効率の高い細胞へ前記外来染色体あるいはその断片を移入させる工程、

(b) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片の所望の部位、及び／又は前記相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の所望の部位に相同組換えによりターゲティングベクターを挿入することにより、前記所望の部位にマーキングを施す工程、および

(c) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片のマーキングを施した部位における欠失および／または転座を生ぜしめる工程

を含む前記方法。

2. 工程 (a) および (b) を経た複数の相同組換え効率の高い細胞を全細胞融合した後、工程 (c) を行う上記 1 記載の方法。

3. 複数の相同組換え効率の高い細胞が、異なる外来染色体あるいはその断片を保持するものである上記 2 記載の方法。

4. 改変された外来染色体あるいはその断片を保持する細胞が動物細胞である上記 1 記載の方法。

5. 動物細胞が哺乳動物細胞である上記 4 記載の方法。

6. 動物細胞がヒト以外の動物の細胞である上記 4 記載の方法。

7. ターゲティングベクターがテロメア配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記テロメア配列が所望の部位に導入される上記 1 記載の方法。

8. テロメア配列の導入された部位に欠失を生ぜしめる上記 2 記載の方法。

9. ターゲティングベクターが部位特異的組換え酵素の認識配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記部位特異的組換え酵素の認識配列が所望の部位に導入される上記 1 記載の方法。

10. 部位特異的組換え酵素の認識配列を含むターゲティングベクターの挿入と同時にあるいは挿入後に、部位特異的組換え酵素を発現できるベクターを相同組換え効率の高い細胞に導入し、前記部位特異的組換え酵素活性を発現せしめることにより、部位特異的組換え酵素の認識配列が導入された部位において外来染色体あるいはその断片の欠失および／または転座を生ぜしめる上記9記載の方法。
11. 転座が、複数の外来染色体あるいはその断片の間で行われるものである上記10記載の方法。
12. 複数の外来染色体が、同種の生物由来である上記11記載の方法。
13. 同種の生物がヒトである上記12記載の方法。
14. 複数の外来染色体が、異種の生物由来である上記11記載の方法。
15. 異種の生物がヒトおよびマウスである上記14記載の方法。
16. 転座が、外来染色体あるいはその断片と相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の間で行われるものである上記10記載の方法。
17. 部位特異的組換え酵素がCre酵素である上記9記載の方法。
18. 部位特異的組換え酵素の認識配列がLoxP配列である上記9記載の方法。
19. 相同組換え効率の高い細胞が胚性幹細胞（ES細胞）である上記1記載の方法。
20. 相同組換え効率の高い細胞がニワトリDT-40細胞である上記1記載の方法。
21. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞を選抜する工程をさらに含む上記1記載の方法。
22. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞の選抜が、マーカー遺伝子の発現に基づくものである上記21記載の方法。
23. マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子である上記22記載の方法。
24. マーカー遺伝子がオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein）遺伝子あるいはその改変体遺伝子である上記22記

載の方法。

25. 外来染色体あるいはその断片がヒト由来である上記1記載の方法。

26. 改変された外来染色体あるいはその断片を保持するキメラ非ヒト動物の作製方法であって、下記の工程；

(a) 外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により相同組換え効率の高い細胞へ前記外来染色体あるいはその断片を移入させる工程、

(b) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片の所望の部位、及び／又は前記相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の所望の部位に相同組換えによりベクターを挿入することにより、前記所望の部位にマーキングを施す工程、

(c) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片のマーキングを施した部位における欠失および／または転座を生ぜしめる工程、および

(d) 前記の欠失または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記の欠失または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を分化多能性を保持する非ヒト動物細胞に移入させる工程を含む前記方法。

27. 工程(a)および(b)を経た複数の相同組換え効率の高い細胞を全細胞融合した後、工程(c)を行う上記26記載の方法。

28. 複数の相同組換え効率の高い細胞が、異なる外来染色体あるいはその断片を保持するものである上記27記載の方法。

29. ターゲティングベクターがテロメア配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記テロメア配列が所望の部位に導入される上記26記載の方法。

30. テロメア配列の導入された部位に欠失を生ぜしめる上記29記載の方法。

31. ターゲティングベクターが部位特異的組換え酵素の認識配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記部位特異的組換え酵素の認識配列が所望の部位に導入される上記26記載の方法。

32. 部位特異的組換え酵素の認識配列を含むターゲティングベクターの挿入と同時にあるいは挿入後に、部位特異的組換え酵素を発現できるベクターを相同組換え効率の高い細胞に導入し、前記部位特異的組換え酵素活性を発現せしめることにより、部位特異的組換え酵素の認識配列が導入された部位において外来染色体あるいはその断片の欠失および／または転座を生ぜしめる上記31記載の方法。
33. 転座が、複数の外来染色体あるいはその断片の間で行われるものである上記32記載の方法。
34. 転座が、外来染色体あるいはその断片と相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の間で行われるものである上記32記載の方法。
35. 部位特異的組換え酵素がCre酵素である上記31記載の方法。
36. 部位特異的組換え酵素の認識配列がLoxP配列である上記31記載の方法。
37. 相同組換え効率の高い細胞が胚性幹細胞（ES細胞）である上記26記載の方法。
38. 相同組換え効率の高い細胞がニワトリDT-40細胞である上記26記載の方法。
39. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞を選抜する工程をさらに含む上記26記載の方法。
40. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞の選抜が、マーカー遺伝子の発現に基づくものである上記39記載の方法。
41. マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子である上記40記載の方法。
42. マーカー遺伝子がオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein）遺伝子あるいはその改変体遺伝子である上記40記載の方法。
43. 工程（d）において、相同組換え効率の高い細胞からマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片をCHO細胞に移入し、次いで、該CHO細胞が

WO 00/10535  
らマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記欠失および／  
または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を分化多能性を保持す  
る細胞に移入させる上記26記載の方法。

44. 分化多能性を有する細胞が胚性幹細胞（ES細胞）である上記26記載の  
方法。

45. 外来染色体あるいはその断片がヒト由来である上記26記載の方法。

46. 改変された外来染色体あるいはその断片を保持する非ヒト動物の作製方法であっ  
て、下記の工程；

(a) 外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合  
により相同組換え効率の高い細胞へ前記外来染色体あるいはその断片を移入させる工  
程、

(b) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片の所  
望の部位、及び／又は前記相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の所望の部位  
に相同組換えによりベクターを挿入することにより、前記所望の部位にマーキ  
ングを施す工程、

(c) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片のマ  
ーキングを施した部位における欠失および／または転座を生ぜしめる工程、

(d) 前記の欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含むミ  
クロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記の欠失または転座を生じた外  
来染色体あるいはその断片を非ヒト動物由来の細胞に移入させる工程、および

(e) 前記非ヒト動物由来の細胞の核を、同種の非ヒト動物の除核した未受精卵に移植  
する工程

を含む前記方法。

47. 工程（a）および（b）を経た複数の相同組換え効率の高い細胞を全  
細胞融合した後、工程（c）を行う上記46記載の方法。

48. 複数の相同組換え効率の高い細胞が、異なる外来染色体あるいはその  
断片を保持するものである上記47記載の方法。

49. ターゲティングベクターがテロメア配列を含み、該ターゲティングベ  
クターの挿入により前記テロメア配列が所望の部位に導入される上記46

記載の方法。

50. テロメア配列の導入された部位に欠失を生ぜしめる上記49記載の方法。

51. ターゲティングベクターが部位特異的組換え酵素の認識配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記部位特異的組換え酵素の認識配列が所望の部位に導入される上記46記載の方法。

52. 部位特異的組換え酵素の認識配列を含むターゲティングベクターの挿入と同時にあるいは挿入後に、部位特異的組換え酵素を発現できるベクターを相同組換え効率の高い細胞に導入し、前記部位特異的組換え酵素活性を発現せしめることにより、部位特異的組換え酵素の認識配列が導入された部位において外来染色体あるいはその断片の欠失および／または転座を生ぜしめる上記51記載の方法。

53. 転座が、複数の外来染色体あるいはその断片の間で行われるものである上記52記載の方法。

54. 転座が、外来染色体あるいはその断片と相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の間で行われるものである上記52記載の方法。

55. 部位特異的組換え酵素がCre酵素である上記51記載の方法。

56. 部位特異的組換え酵素の認識配列がLoxP配列である上記51記載の方法。

57. 相同組換え効率の高い細胞が胚性幹細胞（ES細胞）である上記46記載の方法。

58. 相同組換え効率の高い細胞がニワトリDT-40細胞である上記46記載の方法。

59. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞を選抜する工程をさらに含む上記46記載の方法。

60. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞の選抜が、マーカー遺伝子の発現に基づくものである上記59記載の方法。

61. マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子である上記60記載の方法。

62. マーカー遺伝子がオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein) 遺伝子あるいはその改変体遺伝子である上記60記載の方法。
63. 工程 (d) において、相同組換え効率の高い細胞からマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片をCHO細胞に移入し、次いで、該CHO細胞からマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を非ヒト動物由来の細胞に移入させる上記46記載の方法。
64. 非ヒト動物由来の細胞が、胚または胚盤胞由来の培養細胞である上記46記載の方法。
65. 非ヒト動物由来の細胞が、胎児または成体由来の培養細胞である上記46記載の方法。
66. 非ヒト動物由来の細胞が、胎児由来の繊維芽細胞である上記46記載の方法。
67. 外来染色体あるいはその断片がヒト由来である上記46記載の方法。
68. 外来染色体あるいはその断片の欠失により生じた染色体断片を保持する非ヒト動物。
69. 欠失により生じた染色体断片が、  
 ( i ) マーカー遺伝子およびテロメア配列、および／または  
 ( i i ) 部位特異的組換え酵素の認識配列  
 を有するものである上記68記載の非ヒト動物。
70. 複数の外来染色体あるいはその断片の間の転座により生じた組換え外来染色体を保持する非ヒト動物。
71. 組換え外来染色体が、  
 ( i ) マーカー遺伝子およびテロメア配列、および／または  
 ( i i ) 部位特異的組換え酵素の認識配列  
 を有するものである上記70記載の非ヒト動物。
72. 組換え外来染色体の保持が、非ヒト動物細胞の核内において独立したものである



上記70記載の非ヒト動物。

73. 組換え外来染色体がヒト由来である上記70記載の非ヒト動物。

74. 組換え外来染色体がヒト14番染色体とヒト2番染色体由来である上記70記載の非ヒト動物。

75. 組換え外来染色体がヒト14番染色体とヒト22番染色体由来である上記70記載の非ヒト動物。

76. 組換え外来染色体がヒト抗体重鎖遺伝子と軽鎖 $\lambda$ 遺伝子を含む上記70記載の非ヒト動物。

77. 組換え外来染色体がヒト抗体重鎖遺伝子と軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む上記70記載の非ヒト動物。

78. マウスである上記70記載の非ヒト動物。

79. 有蹄類である上記70記載の非ヒト動物。

80. ウシである上記70記載の非ヒト動物。

81. ヒツジである上記70記載の非ヒト動物。

82. 鳥類である上記70記載の非ヒト動物。

83. ニワトリである上記70記載の非ヒト動物。

84. 染色体あるいはその断片の欠失および／または転座により生じた組換え染色体あるいは染色体断片であって、

(i)マーカー遺伝子およびテロメア配列、および／または

(ii)部位特異的組換え酵素の認識配列

が導入され、かつ、ヒト染色体の少なくとも一部の領域を含む前記組換え染色体あるいは染色体断片を保持する細胞。

85. 細胞中で外来染色体あるいはその断片を改変する方法であって、下記の工程：

(a) 外来染色体あるいはその断片を含むミクロセルを作製し、該ミクロセルとの融合により相同組換え効率の高い細胞へ前記外来染色体あるいはその断片を移入させる工程、

(b) 前記相同組換え効率の高い細胞において、~~前記外来染色体あるいは~~その断片の所望の部位、及び／又は前記相同組換え効率の高い細胞に由来

する染色体の所望の部位に相同組換えによりターゲティングベクターを挿入することにより、前記所望の部位にマーキングを施す工程、および

(c) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片のマーキングを施した部位における欠失または転座を生ぜしめる工程

を含む前記方法。

86. ヒト 1 4 番あるいは 2 1 番染色体由来のセントロメア配列および部位特異的組換え酵素の認識配列を含む人工染色体ベクター。

87. 部位特異的組換え酵素の認識配列がLoxP配列である上記86記載の人工染色体ベクター。

88. 染色体あるいはその断片の欠失および／または転座により生じた組換え染色体あるいは染色体断片であって、

(i) マーカー遺伝子およびテロメア配列、および／または

(ii) 部位特異的組換え酵素の認識配列

が導入され、かつ、ヒト染色体の少なくとも一部の領域を含む前記組換え染色体あるいは染色体断片。

89. ヒト 1 4 番染色体断片およびヒト 2 2 番染色体断片を含む上記88に記載の組換え染色体あるいは染色体断片。

90. ヒト 1 4 番染色体断片およびヒト 2 番染色体断片を含む上記88記載の組換え染色体あるいは染色体断片。

91. ヒト抗体重鎖遺伝子およびヒト抗体軽鎖 $\lambda$ 遺伝子を含む上記88記載の組換え染色体あるいは染色体断片。

92. ヒト抗体重鎖遺伝子およびヒト抗体軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む上記88記載の組換え染色体あるいは染色体断片。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願平 10 - 236169 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

## 図面の簡単な説明

図1は、ヒト2番染色体（断片）を保持するA9細胞の解析（PCR解析）の結果が示されている。

図2は、E14耐性株においてヒト22番染色体（断片）が保持されていることが示されている（PCR解析）。

図3は、22番染色体導入ES細胞由来キメラマウスにおいてヒトL1配列が保持されていることを示す電気泳動写真である（サザン解析）。

図4は、ヒト22番染色体導入キメラマウス臓器におけるヒト染色体の保持の様子を示す電気泳動写真である（PCR解析）。

図5は、ヒト22番染色体導入キメラマウスにおけるヒト遺伝子発現（RT-PCR）の結果を示す電気泳動写真である。

図6は、ヒト22番染色体導入キメラマウス臓器におけるヒト遺伝子発現（RT-PCR）の結果を示す電気泳動写真である。

図7は、E14耐性株においてヒト4番染色体（断片）が保持されていることが示されている（PCR解析）。

図8は、ヒト4番染色体導入E14細胞株におけるヒトL1配列の検出（サザン解析）の結果を示す電気泳動写真である。

図9は、ヒト4番染色体導入ES細胞由来キメラマウスにおいてヒトL1配列が保持されていることを示す電気泳動写真である（サザン解析）。

図10は、TT2耐性株においてヒト14番染色体（断片）が保持されていることが示されている（PCR解析）。

図11は、ヒト14番染色体導入ES細胞由来キメラマウス臓器におけるヒト染色体の保持の様子を示す電気泳動写真である（PCR解析）。

図12は、尻尾由来繊維芽細胞G418耐性テストの結果が示されている。

図13は、ヒト血清アルブミン免疫キメラマウス血清中のヒト抗体IgM濃度（ELISA）が示されている。

図14は、ヒト血清アルブミン免疫キメラマウス血清中のヒト抗体IgG濃度（ELISA）が示されている。

図15は、ヒトIgM産生ハイブリドーマクローンH4B7の解析（ELISA）の結果が

示されている。

図16は、ヒト2番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を保持するマウスES細胞株（TT2細胞株PG15）のFISH解析の結果を示す染色体の形態の写真である。

図17は、ヒト血清アルブミン免疫キメラマウス血清中の抗ヒト血清アルブミンヒトIgG抗体価の増加が示されている。

図18は、ヒト血清アルブミン免疫キメラマウス血清中の抗ヒト血清アルブミンヒトIg $\kappa$ 抗体価の増加が示されている。

図19は、ヒト22番染色体導入TT2細胞株におけるヒトL1配列の検出（サザン解析）の結果を示す電気泳動写真である。

図20は、ヒト血清アルブミン免疫キメラマウス血清中の抗ヒト血清アルブミンヒトIg $\lambda$ 抗体価の増加が示されている。

図21は、ヒト2番染色体部分断片導入キメラマウスの子孫においてヒト2番染色体部分断片が保持されていることが示されている写真である（PCR解析）。

図22は、ヒト14番染色体導入キメラマウス脾臓において細胞表面にヒト $\mu$ 鎖が発現している細胞の存在を示している（フローサイトメトリー解析）。

図23は、pLoxP-STneo プラスミドDNAの構造を示している。

図24は、マウス抗体重鎖C $\mu$ のゲノムDNAの構造を示している。

図25は、マウス抗体軽鎖 $\kappa$ のゲノムDNAの構造を示している。

図26は、マウス抗体重鎖C $\mu$ ターゲッティングベクターと形質転換体TT2F細胞ゲノムDNAのサザンブロットに使用するプローブと相同組換え体で検出されるDNA断片について示している。

図27は、マウス抗体軽鎖 $\kappa$ ターゲッティングベクターと形質転換体TT2F細胞ゲノムDNAのサザンブロットに使用するプローブと相同組換え体で検出されるDNA断片について示している。

図28は、マウス抗体重鎖相同組換え体及び相同組換え体由来高濃度G418耐性株のサザン解析の結果を示す電気泳動写真である。

図29は、マウス抗体軽鎖相同組換え体のサザン解析の結果を示す電気泳動写真である。

図30は、pLoxP-PGKPuro プラスミドDNAの構造を示している。

図31は、マウス抗体軽鎖 $\kappa$ ターゲットティングベクターと形質転換体TT2F細胞ゲノムDNAのサザンブロットに使用するプローブと相同組換え体で検出されるべきDNA断片について示している。

図32は、マウス抗体軽鎖相同組換え体由来高濃度G418耐性株のサザン解析の結果を示す電気泳動写真である。

図33は、HSA免疫キメラマウス血清中の抗HSAヒトIgH抗体価の増加を示している。

図34は、ヒト14番染色体断片及び、ヒト2番染色体断片を保持する抗体重鎖、抗体軽鎖欠損マウスES細胞のFISH解析の結果を示す写真である。

図35は、HSA免疫キメラマウス血清中の抗HSAヒトIg抗体価の増加を示している。

図36は、ヒト14番染色体断片を含むマウスA9細胞のFISH解析（ヒトセントロメア配列プローブ）の結果を示す写真である。

図37は、ヒト14番染色体断片を含むマウスA9細胞のFISH解析（ヒト染色体特異的プローブ）の結果を示す写真である。

図38は、ヒト染色体断片（14番：SC20、2番：W23）のマウスES細胞における安定性テストの結果を示している。

図39は、ヒト14番染色体断片のマウス個体における安定性解析の結果を示している。

図40は、ヒト22番染色体（断片）を保持するG418耐性雑種細胞のPCR解析の結果を示している。

図41は、断片化ヒト22番染色体を保持するA9細胞のFISH解析の結果を示す写真である。

図42は、交配により確立された完全なヒト抗体を産生するマウス系統の解析結果を示している。

図43は、ヒト2番染色体断片W23を保持するマウス血清中のヒト抗体 $\kappa$ 鎖濃度測定の結果を示している。

図44は、血清マウス $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖濃度測定の結果を示している。

図45は、pBS-TEL/LIFPuroの構造を示す。

図46は、ニワトリDT-40細胞株におけるヒト22番染色体の保持を示す。

図47は、LIF遺伝子座における相同組換え体の同定を示す。

図48は、DT40/#22neo細胞株におけるヒト22番染色体の断片化を示す。

図49は、全長及び断片化ヒト22番染色体を保有するニワトリDT-40細胞株を示す写真である。

図50は、TNF- $\alpha$ 免疫キメラマウス血清中の抗TNF- $\alpha$ ヒトIg $\gamma$ 抗体価の増加を示す。

図51は、キメラマウスにおけるアシアロGM1に対する応答を示す。

図52は、キメラマウスにおけるGM2に対する応答を示す。

図53は、シングルTc/KOマウス末梢血有核細胞のFACS解析の結果を示す。

図54は、シングルTc/KOマウス血清中ヒトIg濃度の測定結果を示す。

図55は、シングルTc/KOマウス血清中ヒトIg $\gamma$ サブクラス濃度の測定結果を示す。

図56は、HSA免疫したダブルTc/KOマウス血清中の抗HSAヒトIg $\gamma$ 抗体価の上昇を示す。

図57は、HSA免疫したダブルTc/KOマウス血清中の抗HSAヒトIg $\kappa$ 抗体価の上昇を示す。

図58はヒト人工染色体 $\lambda$ -HAC、 $\kappa$ -HAC作製の概略を示す。

図59はヒト人工染色体 $\lambda$ -HAC、 $\kappa$ -HAC導入マウス作製の概略を示す。

図60はカセットベクターploxPHygとploxPbsrの構造を示す。

図61はターゲティングベクターpHCF2loxPHyg(F)の構造と相同組換え体の同定法を示す。

図62はターゲティングベクターpHCF2loxPHyg(R)の構造と相同組換え体の同定法を示す。

図63はターゲティングベクターpRNR2loxPbsrの構造と相同組換え体の同定法を示す。

図64はターゲティングベクターpYHZloxPHyg(F)の構造と相同組換え体の同定法を示す。

図65はカセットベクターpTELPuroの構造を示す。

図66はターゲティングベクターpTELPuroCD8A(F)の構造と相同組換え体の同定

法を示す。

図67はターゲティングベクターpTELPuroCD8A(R)の構造と相同組換え体の同定法を示す。

図68はヒト2番染色体上の遺伝子マーカーの存在とCD8A遺伝子座でテロメアトランケートしたクローンCD10におけるヒト2番染色体上の遺伝子マーカーの存在を示す。

図69はクローンCD10におけるpGKPuroプローブを用いたFISHの結果を示す。

図70はCre組換え酵素安定発現ベクターpBS185hisDの構造を示す。

図71はRHFクローンとRHRクローンにおけるloxP間転座後の人工染色体の構造を示す。

図72は、RHFクローンにおけるloxP間転座後のゲノム領域の構造と転座確認のためのPCR同定法を示す。

図73は転座確認のためのPCRの結果を示す。

図74はRHFクローンにおけるpGKPuroプローブと14qter特異的プローブを用いたFISH及び2番染色体特異的プローブと14番染色体プローブを用いたFISHの結果を示す。

図75はHSA免疫したキメラマウスC-10血清中の抗HSAヒトIg $\gamma$ 及びIg $\lambda$ 抗体価の上昇を示す。

発明を実施するための最良の形態

ヒト染色体またはその断片を保持し、該染色体またはその断片上の遺伝子を発現するマウス個体は、

- (1) 標識されたヒト染色体またはその断片を保持する染色体供与細胞の作製
  - (2) 分化多能性を保持するマウス細胞へのマイクロセル法によるヒト染色体またはその断片の移入
  - (3) 上記マウス細胞を用いたキメラマウスの作製
  - (4) キメラマウスにおけるヒト染色体保持及び、ヒト遺伝子発現確認
- の過程を経ることにより得ることができる。なお、ここでは、ヒト染色体またはその断片を保持し、該染色体またはその断片上の遺伝子を発現する非ヒト動物として、マウスを例にとった（以下、このマウスを「ヒト染色体導入マウス」と称する。）。

ここで「ヒト染色体」とは、ヒト細胞由来の天然のDNAと蛋白質の複合体のことを指す。正常なヒト染色体は23種（雄は24種）46本存在し、それぞれ約50～300Mbの長さのDNAを含むとされるが、本発明においては独立染色体として安定に複製、分配が可能な部分断片、およびマウス染色体上に転座し、安定に保持されている部分断片も含まれる。そのDNAの大きさは通常1Mb以上だが、それ以下の場合もある。本発明の特徴は大腸菌、酵母等でのクローニングあるいは細胞からのDNA抽出処理等を行わず、染色体そのものを媒体としてマウス個体でヒト遺伝子を保持、発現させることにある。

また、「ヒト染色体導入マウス」とは、その正常体細胞の全てまたは一部において、単一あるいは複数のヒト染色体あるいはその断片を保持するものを指す。さらには、その正常体細胞の全てまたは一部において、ヒト染色体上の単一あるいは複数のヒト遺伝子を発現しているものを指す。

- (1) 標識されたヒト染色体またはその断片を保持する染色体供与細胞の作製

染色体供与細胞としては、1) 受容細胞で選別可能なマーカーで標識されたヒト染色体を保持し、2) それ以外のヒト染色体を含まない、3) ミクロセル形成能が高い細胞、が望ましい。

ヒト染色体提供の材料としては、ヒト由来のあらゆる細胞株、癌細胞、初代培



養細胞を用いることが出来るが、染色体の欠失、増幅等の異常の可能性が低く、また培養が容易な点を考慮すると正常繊維芽細胞が適している。

まず1) について、ヒト細胞は薬剤（G418, ピューロマイシン, ハイグロマイシン, ブラストサイジン）耐性等のマーカー遺伝子を発現するベクターにより形質転換することができる。ここで用いるマーカー発現制御のためのプロモーターとしては、ヒト細胞のみならず、マウスES細胞のような受容細胞で効率よく働くものが望ましい。この目的にはSV40エンハンサーと単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーターの連結したもの（Katohら, Cell Struct.Funct., 12:575, 1987）、マウスPGK-1プロモーター（Sorianoら, Cell, 64:693, 1991）等を用いることが出来る。エレクトロポレーション（石田ら, 細胞工学実験操作入門, 講談社, 1992）等による形質転換を実施し、選択することにより、導入されたマーカー遺伝子が、23種46本あるヒト染色体上にランダムに挿入されたようなヒト細胞形質転換体のライブラリーを得ることが出来る。

3) については、多くのヒト正常細胞がマイクロセル形成能が非常に低いので、上記の形質転換体をマイクロセル形成能の高い細胞例えば、マウスA9細胞（Oshimura, M., Environ. Health Perspect., 93:57, 1991）と全細胞融合することにより、形成能を付与することが出来る。マウスーヒト雑種細胞では、ヒト染色体が選択的に消失することが知られているが、ここで得られた融合株は、先述のマーカーで選択することにより、マーキングされたヒト染色体を安定に保持することが出来る。

さらに、2) の条件を満たすために、この細胞融合株からマイクロセルを取得し、マウスA9細胞と再度融合することが望ましい。この場合も、ヒト染色体上のマーカーで選択することにより、得られるマイクロセル融合株の多くは、1)、2)、3) の条件を満たしたものであると考えられる。マーキングされたヒト染色体の同定は、最終段階で得られるマウスーヒトモノクロモソーム雑種細胞において、PCR（ポリメラーゼチェーンリアクション、Saikiら, Science, 239:487, 1988）、サザンブロット解析（Ausubelら, Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994）、FISH（フルオレッセンスインサイチューハイブリダイゼーション、Lawrenceら, Cell, 52:51, 1988）解析等により調べるこ

とが出来る。ある特定の染色体導入を望む場合には、多くのヒト細胞形質転換体クローンについて、それぞれ上記の過程を繰り返して、目的染色体がマーキングされたものを探す。あるいは、ヒト細胞形質転換体クローンの混合物について上記の過程を実施し、得られる多数のマウスーヒトモノクロモソーム雑種細胞についてヒト染色体の同定を行なうことが可能である。

さらに、導入を望む染色体上のDNA配列を標的とした相同組換え(Thomas ら, Cell, 51:503, 1987)により、特定の部位にマーカー遺伝子を挿入することも可能である。

マウスーヒト雑種細胞から調製したマイクロセルにガンマ線照射することにより、マーキングされたヒト染色体を断片化してマウスA9細胞に導入することも出来る。また、マイクロセルにガンマ線照射しない場合でも、ある割合で部分断片化したヒト染色体が移入されることがある。これらの場合、得られるマイクロセル融合株は、マーキングされたヒト染色体の部分断片を保持している。これらは、受容細胞に染色体部分断片を導入したい場合に用いることができる。

ES細胞に導入されるヒト染色体には欠失、転座、置換等の改変を施しうる。これらは具体的には以下の方法で達成される。

1) 上記に既述のマウスーヒト雑種細胞の作製、マウスーヒト雑種細胞からのマイクロセル誘導、該マイクロセルとマウスA9細胞の再融合、該再融合細胞からのマイクロセル誘導、該マイクロセルとマウスES細胞の融合の各過程において、ヒト染色体の欠失、転座が起こる場合がある。これらの変異染色体を保持する細胞を、染色体の顕微鏡観察、PCR、サザン解析等により適宜選抜する。種々のヒト染色体を保持するマウスA9細胞ライブラリから所望の変異染色体を保持するクローンを選抜することも可能であり、特定のヒト染色体を保持するマウスA9細胞からマイクロセルを誘導し、A9細胞あるいはES細胞に融合したもののなかから所望の変異染色体を保持するクローンを選抜することも可能である。また、染色体の断片化はガンマ線照射によりその発生頻度をあげることができる(Koiら, Science, 260:361, 1993)。

2) ヒト染色体を保持する細胞において、Cre酵素の認識配列であるloxP配列を保持するターゲティングベクターを構築し、相同組換えにより染色体上の

所望の位置に  $loxP$  配列の挿入されたクローンを取得の後、 $Cre$  酵素を細胞内で発現させることにより、部位特異的組換えにより染色体の欠失・転座等の変異体を得る。W097/49804およびSmithら、Nature Genetics, 9:376, 1995を参照のこと。また、ターゲティングベクターの導入に際しての宿主細胞として、ニワトリDT-40細胞（Diekenら、Nature Genetics, 12:174, 1996）のような相同組換え頻度の高い細胞を用いることもできる。

3) ヒト染色体を保持する細胞において、ヒトテロメア配列を保持するターゲティングベクターを構築し、相同組換えにより染色体上の所望の位置にテロメア配列の挿入されたクローンを取得の後、テロメア・トランケーションによる欠失変異体を得る。Itzhakiら、Nature Genet., 2, 283-287, 1992;及びBrownら、P. N. A. S., 93:7125, 1996を参照のこと。また、ターゲティングベクターの導入に際しての宿主細胞として、ニワトリDT-40細胞（Diekenら、前記）のような相同組換え頻度の高い細胞を用いることもできる。ニワトリDT-40細胞におけるヒト染色体のテロメア・トランケーションは本発明において初めて開示された。前記Brownらの開示はベクターの挿入が染色体上のリピート配列に対するものであり、特定の位置をターゲットできるものではない。Itzhakiらの開示によれば、ヒトテロメア配列を導入した腫瘍細胞の一種であるHT1080細胞株を12000株に渡って解析した結果8個の相同組換え体を取得し、そのうちわずか1株においてテロメア配列による欠失を見出したに過ぎない。また、細胞によってはテロメア配列が挿入されてもトランケーション体が全く得られないという結果も報告されているが（Barnettら、Nucleic Acids Res., 21:27, 1993）、発明者らはトランケーション体を得るためにはともかくも相同組換え体の絶対数を増やすことが必要と考え、ニワトリDT-40細胞を宿主としたテロメア・トランケーションを試みた。その結果、予想外のことに取得された8個の相同組換え体のすべてにおいて、トランケーションが起こっていることを見出した。

以上に開示された導入染色体の改変により、ヒト染色体導入マウスにおいて発現させたくない遺伝子を排除することができる。また、導入される染色体のサイズの縮小化により、導入される染色体断片をヒト染色体導入マウスの子孫に伝達することが可能となる。さらに、染色体の転座、置換により、複数の染色体由来

の遺伝子を同一の染色体断片上において発現させること、染色体断片上の複数の遺伝子の一部を異なる遺伝子に置き換えること、すなわち、外来染色体断片をマウス個体及びマウス細胞への遺伝子導入用のベクターとして用いることが可能となる。

ヒト染色体の人為的改変の方法については以下にさらに詳細に述べる。

従来は、偶発的に断片化したヒト染色体断片やヒト染色体全長そのものがマウスへの導入に使われてきた (Tomizukaら, *Nature Genet.*, 16:133, 1997)。この場合、導入されるヒト染色体によっては、マウス中で不安定であったり、あるいは、導入染色体上のヒト遺伝子がマウスの発生に影響を及ぼし、ヒト染色体導入マウス自体が生まれてこないといった問題に直面する可能性がある。また、ヒトやマウスにおいては異常染色体の存在は減数分裂を阻害すると考えられており、導入ヒト染色体が子孫に伝達できないことが想像される (Tomizukaら, *Nature Genet.*, 16:133, 1997)。実際、富塚ら (*Nature Genet.*, 16:133, 1997) の報告においてはヒト14番染色体(約100Mb)の半分程度の領域を含む断片を保持する雄キメラマウスは不妊となり、当該断片は子孫伝達しなかった。一方、富塚らの報告 (*Nature Genet.*, 16:133, 1997) にある2番染色体断片W23(5~20Mbと考えられる; Rastan, *Nature Genet.*, 16:113, 1997)や本願実施例中にある14番染色体断片SC20(W23より幾分大きい)のような小さな染色体断片は子孫伝達可能であった。すなわち、より小さな染色体断片の利用が子孫伝達の可能性を高めると考えられる。

望みのヒト染色体領域を含み、それを安定保持し、子孫伝達するようなマウスを作製するためには、偶発的に生じた染色体断片ではなく、ヒト染色体を所望の部位で切断したり、所望の染色体断片のみを別の安定な染色体につなげるなどといった染色体を自在に加工する技術が望まれる。このような技術は、染色体工学と呼ばれ、これまで主にマウスES細胞中で内在性マウス染色体を部位特異的に切断したり (WO 98/54348)、相同染色体間で組換え(転座)を起こさせることで特定の遺伝子領域を欠失・逆位・倍加させ、そのような改変染色体を有する変異マウスが作製されてきた (R. Ramirez-Solisら, *Nature* 378:720, 1995)。一方、このような様々な人工的改変を施されたヒト染色体を保持するマウスなどの非ヒ

ト動物の作製についてはこれまで報告がない。また最近、哺乳動物細胞中で安定に保持されるべき人工染色体 (Mammalian Artificial Chromosome, MAC) ベクターの開発が報告されている (例えば, W. Millsら、Human Molecular Genetics 8:751, 1999) が、YACベクターのクローニングサイズを越えるゲノム領域のクローニングを可能にする普遍的な人工染色体の構築に関する報告はない。

そこで、本発明において、ヒト抗体遺伝子クラスターをクローニングしたヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome, HAC) の作製を実施例に挙げ、あらゆる染色体断片のクローニングを可能にする普遍的なヒト人工染色体作製システムを開示する。以下に、ヒト抗体 $\lambda$ 軽鎖、 $\kappa$ 軽鎖遺伝子クラスターをクローニングしたヒト人工染色体 $\lambda$ 、 $\kappa$ -HACの作製について述べる。さらには、作製されたHACのマウス個体への導入、HACに含まれるヒト抗体遺伝子のマウス個体における発現、HACのキメラマウス子孫への伝達について述べる。

#### A. ヒト 2 2 番染色体の改変

ヒト抗体 $\lambda$ 軽鎖遺伝子クラスターは 2 2 番染色体上の 22q11.2 に存在する (例えば, J.E. Collinsら、Nature 377:367, 1995)。この染色体領域周辺のみを人工染色体作製に用いるために、まず、 $\lambda$ 軽鎖遺伝子クラスターの極テロメア側に位置する LIF 遺伝子座にヒトテロメア配列を相同組換えにより挿入しテロメアトランケーション (例えば、黒岩ら、Nucleic Acid Research, 26:3447, 1998) することで染色体を切断する。次に、 $\lambda$ 軽鎖遺伝子クラスターの極セントロメア側に位置する HCF2 遺伝子座に組換え酵素 Cre の認識配列である loxP 配列を相同組換えにより挿入し、HCF2-Ig $\lambda$ -LIF断片のみを人工染色体作製に用いることとする。この 2 2 番染色体断片のみをクローニングすることにより、マウスの発生に影響を及ぼす可能性がある 2 2 番染色体上の Cat Eye 症候群 (例えば, Johnson.Aら、Genomics 57:306, 1999) や DiGeorge 症候群 (例えば, H. Yamagishiら、SCIENCE 283:1158, 1999) の原因遺伝子領域を排除することができる。

#### B. ヒト 2 番染色体の改変

ヒト抗体 $\kappa$ 軽鎖遺伝子クラスターは 2 番染色体上の 2p11.2 に存在する (例えば,

WO 00/10385  
Gottfried M. ら、Genomics 16:512, 1993)。この染色体領域周辺のみを人工染色体作製に用いるために、まず、 $\kappa$  軽鎖遺伝子クラスターの極テロメア側に位置するCD8A遺伝子座（例えば、Gottfried M. ら、Genomics 16:512, 1993）にヒトテロメア配列を相同組換えにより挿入しテロメアトランケーションすることで染色体を切断する。次に、 $\kappa$  軽鎖遺伝子クラスターの極セントロメア側に位置するcosYHZ304ゲノム領域に組換え酵素Creの認識配列であるloxP配列を相同組換えにより挿入し、cosYHZ304-Ig $\kappa$ -CD8A断片のみを人工染色体作製に用いることとする。

### C. ヒト14番染色体断片SC20の改変

ヒト14番染色体断片SC20はマウス中において、ほぼ100%保持され、かつ子孫伝達することが示されている。そこで本発明において、このSC20をヒト人工染色体ベクターとして用いることを考える。つまり、上記A、Bで記したHCF2-Ig $\lambda$ -LIFヒト22番染色体断片やcosYHZ304-Ig $\kappa$ -CD8Aヒト2番染色体断片をSC20へ転座させることでヒト22番、2番染色体断片をクローニングしたヒト人工染色体 $\lambda$ ,  $\kappa$ -HACを構築することとする。14番染色体上14p12に位置するRNR2遺伝子座にloxP配列を相同組換えにより挿入し、Cre-loxPシステム（例えば、R. Ramirez-Solisら、Nature 378:720, 1995）を用いることで、HCF2-Ig $\lambda$ -LIFヒト22番染色体断片やcosYHZ304-Ig $\kappa$ -CD8Aヒト2番染色体断片をSC20上RNR2遺伝子座に転座させることでクローニングする。

上記A、B、Cで記したテロメアトランケーションや相同組換えを効率良く行うための宿主細胞としてニワトリDT-40細胞を利用することができる（例えば、黒岩ら、Nucleic Acid Research 26:3447, 1998とDiekenら、Nature Genet., 12:174, 1996）。

また、富塚ら（Nature Genet., 16:133, 1997）の報告に記載された方法で作製されたモノクロモソーム雑種細胞ライブラリーからスクリーニングされたヒト21番染色体（断片）もキメラマウス個体において非常に安定であることが見出された。具体的には、ヒト21番染色体の大部分を含む染色体断片を保持するマウスES細胞からキメラマウス（キメラ率95%以上）が作製された。このキメラマウス

スの脳細胞、肝臓細胞及び尻尾由来繊維芽細胞における染色体保持率は全て95%以上であった。よってヒト21番染色体及びその断片も上記SC20と同様にヒト人工染色体ベクターとして用いることができると考えられる。

D. Cre-loxPシステムによるHCF2-Ig $\lambda$ -LIFヒト22番染色体断片とcosYHZ304-Ig $\kappa$ -CD8Aヒト2番染色体断片のSC20上への転座

上記A、B、Cで示したように、改変ヒト22番、2番染色体断片あるいは、改変SC20のいずれかを1本保持するニワトリDT-40細胞を作製する。次に、Cre-loxPシステムを用いてHCF2-Ig $\lambda$ -LIFヒト22番染色体断片あるいはcosYHZ304-Ig $\kappa$ -CD8Aヒト2番染色体断片をSC20上へ転座させるために、いずれかの改変ヒト染色体断片を1本保持するニワトリDT-40細胞同志を融合させることによって、2本の改変ヒト染色体断片を保持するニワトリDT-40細胞ハイブリッドを作製する。これで、転座のための材料が揃ったことになる。次に、Cre組換え酵素をこのニワトリDT-40細胞ハイブリッド中で発現させて転座させるわけだが、2本の非相同染色体間での組換え（転座）頻度は非常に低いことが報告されており（例えば、A. J. Smithら、Nature Genet., 9:376, 1995）、さらに本発明の場合は、内在性染色体間ではなく、外来性のヒト染色体間での転座であり、さらに組換え効率が低くなる可能性も考えられる。そこで、期待通りloxP間で組換えが起こった細胞を選択できるポジティブセレクション系を考えなくてはならない。

近年、A. J. H. Smithら（Nature Genet., 9:376, 1995）はマウスES細胞中で、12番染色体と15番染色体とをCre-loxPシステムを用いて相互に転座させることに成功した。彼らはHprt（ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ）遺伝子欠損ES細胞に対して、Hprt遺伝子の5'側部分（loxPを含む）と3'側部分（loxPを含む）とをそれぞれ12番、15番染色体の特定領域に相同組換えにより挿入した。そして、Creを一過性発現させ、loxP間で組換えが起こったときのみHprt遺伝子が再構成され、そのES細胞はヒポキサンチンを含まない培地（HAT培地）でも増殖できるようになる。この選択法は、Hprt遺伝子欠損細胞に対してのみに用いることができ、いかなる細胞に対しても利用できるわけではない。また、Qin, M.ら（PNAS 91:1706, 1994）が報告しているように、Hprt遺

伝子の代わりに適当な薬剤耐性遺伝子が転座の結果再構成され、その薬剤を含む培地中で目的の細胞が増殖してくるというセレクション法もある。本発明においては、いかなる細胞に対してでも利用でき、かつ迅速に目的細胞を濃縮できる以下のようなシステムを考えた。

近年、動物細胞への遺伝子導入におけるレポータ遺伝子としてオワンクラゲ由来のGFP(Green Fluorescent Protein)遺伝子(例えば、Prasher, D. C.ら, *Gene*, 111:229, 1992)及びその改変体(例えば、Heimら, *Nature*, 373:663, 1995)が開発された。GFPの発光には基質は必要でなく、蛍光で検出することが可能であるので、生細胞のまま、しかも短時間でモニターすることができる。さらに、GFPの発現量がたとえ低くてもタンパク質自体が安定であるため徐々に細胞内に蓄積され、検出が可能になると思われる。また、FACSを用いることによって、非常に微弱な蛍光でも検出できるであろう。以上の点から、本発明においては、loxP組換え体のポジティブセレクションマーカーとして、GFP遺伝子を用いることとした。具体的には、プロモーターを含まないGFP遺伝子をSC20上 RNR2遺伝子座にloxPと共に挿入し、GFPの発現に必要なプロモーターをヒト2番染色体上のHCF2遺伝子座あるいは、2番染色体上のcosYHZ304ゲノム領域にloxPと共に挿入する。CreによるloxP配列間での組換えが起こると、プロモーターとGFP遺伝子とが連結され、GFPが発現するようになる。この組換え細胞は蛍光を発光するので、FACSによるソーティングが可能となる。前述したように、GFPの発現は短時間で検出可能なので、FACSソーティングを繰り返すことによって、薬剤セレクションと比較して、より迅速にGFP陽性細胞を濃縮することが可能と考えられる。さらに、組換え頻度を上げるために、Cre組換え酵素を一過性ではなく、安定発現させることを考える。2本の染色体間での転座は相互的に起こるので、Cre組換え酵素を安定発現させると、せっかく転座を起こした染色体が、頻度こそは低いながらも、再び組換え(転座)を起こして元に戻ってしまう可能性がある。そこで、通常このような実験においてはCre組換え酵素を一過性に発現させたり、Cre組換え酵素の発現を厳密にコントロールしたりする必要性がある。しかし、本発明においては、DT40ハイブリッド中で転座させた直後に目的の転座したヒト人工染色体をミクロセル法(microcell-mediated chromosome transfer: 以下、「MMCT」と記



す。)によりチャイニーズハムスターCHO細胞へ移入させるため、移入先であるCHO細胞中においては、Cre組換え酵素の影響を受けずに済む。そこで、厳密な発現コントロールは必要なく、単純にCre組換え酵素を安定発現させることが可能となる。後述するが、非ヒト細胞（本発明では、ニワトリDT-40細胞）において、2本の非相同ヒト染色体間で転座が成功したのは本発明が初めてである。

上記A、B、C、Dで開示したように、ニワトリDT-40細胞中での一連のテロメアトランケーションとCre-loxPシステムによる染色体間転座を用いることによって、如何なるサイズのあらゆるヒト染色体断片（YACベクターのクローニングサイズを越える）をも安定なSC20染色体ベクター上のloxP部位（14p12）にクローニングすることができ、ここにヒト人工染色体構築システムを提案できる。ここに開示したヒト人工染色体構築システムはニワトリDT-40細胞で行うことが望ましい。なぜなら、通常の培養動物細胞では相同組換えの頻度が非常に低いからである。一方、ニワトリDT-40細胞以外で相同組換え頻度の高い動物細胞としてはマウスES細胞が知られている（相沢慎一，バイオマニュアルシリーズ8，ジーンターゲットィング，羊土社，1995）。すなわち、本願に示されるヒト人工染色体構築はマウスES細胞において行うことも可能である。しかしながら、マウスES細胞は多様な組織への分化能を有しており、未分化な状態を保ちつつ培養するためには煩雑な操作（例えば、栄養細胞の培養）と熟練が必要とされる（相沢慎一，前記）。また、導入染色体の種類によっては、分化してしまう恐れもある（W097/07671）。すなわち、マウスES細胞には以上の問題点があるため、人工染色体構築の場として通常はニワトリDT-40細胞を利用することが望ましい。

一方、実施例に示したヒト染色体同士の組換えだけでなく、ヒト染色体の所望の領域（断片）をマウスES細胞に由来するマウス染色体に転座させることも可能である。これは例えば、以下の(1)～(4)の手順で可能である。

(1) マウスES細胞自身の染色体上に相同組換えにより部位特異的組換え酵素の認識配列、例えばloxP配列を挿入する。loxP配列を含むターゲティングベクターには例えば下記GFP等のマーカーを発現させるためのプロモーター配列が含まれる。loxP配列の挿入部位は、マウス自身の遺伝子に対する影響を避けるために、例えばマウス染色体のサブテロメア領域が望ましい。

(2) 所望の領域を含むヒト染色体を保持するニワトリDT-40細胞において以下の操作A、Bを行う。

(2) - A ヒト染色体上の所望の領域のテロメア側にテロメア配列を挿入し、当該染色体を短縮化する。前記所望の領域が前記ヒト染色体の本来のテロメアの近傍にある場合にはこの操作は不要な場合がある。

(2) - B ヒト染色体上の所望の領域のセントロメア側に部位特異的組換え酵素の認識配列、例えばloxP配列を挿入する。loxP配列を含むターゲティングベクターには例えばGFP遺伝子が含まれる。

(3) 上記(2)において作製されたヒト染色体(断片)をCHO細胞にマイクロセル移入し、さらに当該ヒト染色体断片をCHO細胞から上記(1)で作製されたマウスES細胞に移入する。

(4) 上記(3)で作製されたヒト染色体(断片)を保持するマウスES細胞において部位特異的組換え酵素を発現させる。loxP配列において部位特異的組換えを起こした細胞においては前記プロモーター配列とGFP遺伝子が連結し、GFPが発現し、当該細胞を選択することができる。

以上の工程により、自身の染色体に所望のヒト染色体領域(断片)が転座したマウスES細胞を得ることができる。当該マウスES細胞からは、当該ヒト染色体領域(断片)を安定に保持するキメラマウスあるいはその子孫を作製することが出来る。

上記のヒト人工染色体構築システムにより作製されたヒト人工染色体はマウスES細胞に導入される前に、チャイニーズハムスターCHO細胞に導入されるとよい。Diekenら(Nature Genet., 12:174, 1996)は、改変ヒト染色体をニワトリDT-40細胞からマウスMEL細胞(ガン細胞の一種)へ移入したが、大部分が断片化された状態で移入された。発明者らもニワトリDT-40細胞からマウスA9細胞などへヒト染色体の移入を試みたが、全てヒト染色体の断片化が観察され、無傷の状態で移入されることはなかった。しかしながら、チャイニーズハムスターCHO細胞へ移入した際に、無傷の状態でヒト染色体を移入し得ることを発明者らは初めて見出した。そこで、本ヒト人工染色体構築システムにより作製されたヒト人工染色体は一度CHO細胞へ移入することとした。CHO細胞はマウスA9細胞と同様に効率良

くマイクロセルを形成することが知られており（例えば、M.Koiら、SCIENCE 260:361, 1993）、これによりヒト人工染色体をCHO細胞からマウスES細胞へ移入し、ヒト人工染色体保持キメラマウスを作製することができると考えられる。また、SC20断片自身は既に子孫伝達することが分かっており、この染色体断片をベクターとして用いている本システムにより作製されたヒト人工染色体（ $\lambda$ ,  $\kappa$ -HAC）も子孫伝達することが期待できる。

前記富塚らの報告（Tomizukaら、Nature Genet., 16:133, 1997）においてマウスに導入されたヒト染色体はヒト繊維芽細胞に由来し、その後マウスA9細胞を経由し、最終的にマウスES細胞に導入された後、キメラマウス及びその子孫において機能した。導入染色体上のヒト遺伝子の転写レベルさらにはタンパク質レベルの発現は、例えばヒト抗体遺伝子について確認された（Tomizukaら、Nature Genet., 16:133, 1997）。一方、ヒト染色体が哺乳動物とは進化的に離れた鳥類の細胞を経由した場合にマウス中で機能する能力を保持しているかどうかについてはこれまでよく分かっていなかった。ニワトリDT-40細胞はトリ由来であるという以外にも、相同組換えの効率が非常に高い（Takedaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:023, 1992）という性質を持っており、例えば導入したヒト染色体上のヒト遺伝子がトリ染色体上の相同なトリ遺伝子との間で遺伝子変換を起こし、不活化されてしまう恐れも想像された。この問題についての唯一の研究はDiekenら（Nature Genet., 12:174, 1996）がニワトリDT-40細胞を経由したヒト11番染色体をマウスMEL細胞に移入したところヒトベータグロビン遺伝子の転写産物が検出されたという報告であるが、ヒト遺伝子のタンパク質レベルでの発現、及び発現したヒトタンパク質の機能に関しては未だ報告が無い。本願においてはニワトリDT-40細胞を経由したヒト染色体上のヒト遺伝子及び当該遺伝子にコードされるタンパク質がマウス個体において機能的であることを示す。ニワトリDT-40細胞において操作されたヒト22番染色体断片（ヒト免疫グロブリン $\lambda$ 鎖遺伝子を含む）を保持するキメラマウスの血清中には、ヒト免疫グロブリン $\lambda$ 鎖タンパク質が検出された。さらにヒト血清アルブミン（HSA）の免疫に応答して抗原特異的ヒト $\lambda$ 鎖を含む抗体価の上昇が確認された。すなわち、発現したヒト免疫グロブリン $\lambda$ 鎖タンパク質は機能的な抗体分子の構成成分として存在していることが示

された。

(2) 分化多能性を保持するマウス細胞へのヒト染色体またはその断片の移入

これまでに、種々の系統のマウス由来の胚性癌腫細胞 (EC細胞、Hanaokaら, *Differentiation*, 48:83, 1991)、胚性幹細胞 (ES細胞、Evansら, *Nature*, 292:154, 1981)、胚性生殖細胞 (EG細胞、Matsuiら, *Cell*, 70:841, 1992) がマウス初期胚に注入あるいは共培養することによりその正常体細胞に寄与する、すなわちキメラマウス作製可能であることが報告されている。ES、EG細胞はその能力が特に高く、多くの場合生殖細胞にも寄与し、その細胞由来の子孫を作ることができる。EC細胞は主に生殖細胞癌から、ES細胞は胚盤胞の内部細胞塊から、EG細胞は発生初期に出現する始原生殖細胞から得られる。本発明におけるヒト染色体移入の受容細胞としてはこれらの細胞株及びその変異株、さらにはマウス個体において全て、あるいは一部の正常体細胞に分化可能なあらゆる未分化細胞を用いることができる。これらの受容細胞は、キメラマウス、キメラマウス由来の組織あるいは細胞において、導入されるヒト遺伝子の発現を好適なものとするため、導入されるヒト遺伝子に相同なマウス遺伝子等の、単一あるいは複数の遺伝子を標的遺伝子相同組換え法 (Joynerら, *Gene Targeting*, 1993, IRL PRESS) 等の方法を用いて破壊することも可能である。

受容細胞へのヒト染色体移入の材料としては (1) で得られたヒト染色体供与細胞から調製されるマイクロセルあるいはガンマ線照射したマイクロセルを用いることができる。受容細胞への移入は清水素行, *細胞工学ハンドブック*, 羊土社, 1992>等に記された方法で受容細胞とマイクロセルを融合することにより行なう。マイクロセル供与細胞においてはあるヒト染色体またはその断片が受容細胞において選別可能なマーカーを保持している。この中から、(1) と同様PCR、サザンブロット解析、FISH解析等により、導入を目的とする遺伝子あるいは染色体あるいはその断片を保持する株を選択すれば、あらゆるヒト染色体、あるいはその断片を導入することが可能である。また、異なる選択マーカーを保持する複数の染色体、あるいはその断片を逐次導入することにより、これらを同時に保持する受容細胞を得ることもできる。さらに、すでにあるヒト染色体を導入した細胞株の中

から、導入染色体数が増加したものを選抜することも可能である。これは通常、培養液中に添加する選択薬剤の濃度を高めることにより達成される。

ヒト染色体上のマーカー（G418耐性等）により選抜された受容細胞が、供与細胞の保持していたヒト染色体の全部あるいは一部を保持していることは、以下のようにして確認される。選抜された受容細胞から抽出したゲノムDNAを用い、プローブとしてヒト特異的繰返し配列（L1、Alu等、Korenbergら、Cell, 53:391, 1988）、ヒト遺伝子等を用いたサザン解析により検出される。また、ヒト遺伝子特異的プライマーによるPCR法、及びヒト染色体特異的プローブ（Lichterら、Human Genetics, 80:224, 1988）を用いたフルオレッセンスインサイチューハイブリダイゼーション（FISH）等の染色体解析により確認することができる。

### （３）ヒト染色体導入ES細胞からのキメラマウス作製

（２）で得られたES細胞株からのキメラマウス作製は、＜相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲティング、羊土社、1995＞等に記された方法で行なう。効率的なキメラマウス作製を行なうための宿主胚の発生時期、系統等の選択については、それぞれのES細胞株についてすでに検討された条件を用いることが望ましい。例えば、CBA×C57BL/6 F1 由来のTT2細胞（野生色、Yagiら、Analytical Biochemistry, 214:70, 1993）についてはBalb/c（白色、日本クレア社）あるいはICR（白色、日本クレア社）由来の8細胞期胚を宿主胚として用いるのが望ましい。

### （４）キメラマウスにおけるヒト染色体の保持及びヒト遺伝子発現

ES細胞株を注入した胚から誕生したマウスにおけるES細胞の貢献率は、その毛色によりおおまかに判定することができる。但し、毛色に全く貢献が見られないからといって他の組織で貢献がないとは断定できない。より詳細な、キメラマウス各組織におけるヒト染色体の保持は各組織より抽出されたゲノムDNAを用いたサザン解析、PCR等によって確認することができる。

導入ヒト染色体上の遺伝子発現は以下のようにして確認される。ヒト染色体由来mRNAの発現は各組織由来RNAを用いたRT-PCR法（Kawasakiら、P.N.A.S., 85:5698, 1988）、ノーザンブロット法（Ausubelら、前記）により検出される。蛋白質レベルの発現は、マウスの相同蛋白質との交差反応性を最小にした抗ヒト蛋白

質抗体による酵素免疫測定法 (ELISA、富山・安東、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィク、1987; 石川、超高感度酵素免疫測定法、学会出版センター、1993)、ウエスタンブロット法 (Ausubelら、前記) あるいは、電気泳動度の違いを利用したアイソザイム分析 (Koi ら、Jpn. J. Cancer Res., 80:413, 1989)等により検出される。さらに、キメラマウス細胞中でのヒト染色体の保持及び該染色体上の遺伝子の発現が、キメラマウス由来初代培養細胞での薬剤耐性マーカー遺伝子発現による耐性細胞の出現より確認できる。

例えば、ヒト免疫グロブリン重鎖の存在するヒト14番染色体を保持するES細胞から作製されたキメラマウスについて、キメラマウス血清中のヒトIgM、IgG、IgA等をマウス抗体との交差反応性を最小にした抗ヒトIg抗体による酵素免疫測定法により検出することができる。また、このキメラマウスをヒト由来抗原 (例えばヒト血清アルブミン) により免疫し、その脾臓細胞とマウスミエローマを融合することにより得られる、ハイブリドーマ (安東・千葉、単クローン抗体実験操作入門、講談社サイエンティフィク、1991) をELISAによりスクリーニングすることにより、ヒト免疫グロブリン重鎖を産生するハイブリドーマを得ることができる。

以上、マウスを例にとり、ヒト染色体またはその断片を保持し、該染色体またはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物の作製法を説明したが、本発明において、キメラ非ヒト動物へ移入される染色体またはその断片は、ヒト由来のものに限られず、広く外来染色体またはその断片を移入し、該染色体またはその断片上の遺伝子を発現させることが可能である。ここで、「外来染色体」とは、分化多能性を保持する細胞へ移入され、キメラ非ヒト動物において、該染色体またはその断片上の遺伝子が発現することを特徴とするものであり、その由来とする生物種は特に限定されるものではない。また、本発明の方法により、キメラマウスのみならず、他のキメラ動物、例えば、ラット、ブタ等の哺乳類その他のキメラ動物も作製することができる。マウス以外の動物種におけるES細胞あるいはES様細胞の樹立はラット (Iannacconeら、Dev. Biol., 163, 288-, 1994)、ブタ (Wheeler ら、Reprod. Fertil. Dev., 6, 563-, 1994)、ウシ (Simsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6143-6147, 1994) において報告され、さらにメ

ダカ、ニワトリ等でも試みられている（トランスジェニック動物，蛋白質核酸酵素，1995年10月号増刊，共立出版）。また、ヒツジにおいてはES様細胞（ED細胞）さらにはそれを10代以上継代して得られる上皮様細胞由来の核を移植された未受精卵が正常に発生することが知られている（Campbellら，Nature，380，64-，1996）。これらESあるいはES様細胞を受容細胞とした外来染色体移入によってマウスの場合と同様に外来染色体あるいはその断片を保持し、該染色体またはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物が作製可能である。

さらに近年の核移植技術の急速な進展により、上記ESあるいはES様細胞よりもさらに分化した胎児や成体の体細胞も核移植のドナーとして利用できるようになった。これまでにヒツジ成体の乳腺細胞（Wilmutら，Nature，385:810，1997）、ウシ胎児の繊維芽細胞（Schniekeら，Science，278:2130，1997）、マウス成体の卵丘細胞（Wakayamaら，Nature，394:369，1998）をドナーとした未受精卵への核移植により生存可能な産仔が得られたとの報告がある。加えて、クローン化された外来DNAを導入した体細胞（胎児由来繊維芽細胞）をドナーとして用いることにより、トランスジェニックヒツジ（Schniekeら，前記）及びウシ（Cibelliら，Science 280:1256，1998）の作製も可能である。

すなわち、外来染色体あるいは外来組換え染色体を移入した体細胞をドナーとした核移植により、当該外来染色体あるいは外来組換え染色体を保持し、発現する動物個体の作製が可能であると考えられる。これは例えば、以下の手順（1）～（5）により可能である。

（1）Ig $\lambda$ 領域を含むヒト22染色体を保持するニワトリDT-40細胞において以下の操作A、Bを行う。

（1）－A ヒト22染色体上のIg $\lambda$ 領域のテロメア側にテロメア配列を挿入し、当該染色体を短縮化する。

（1）－B ヒト22染色体上のIg $\lambda$ 領域のセントロメア側（例えばHCF遺伝子座）に部位特異的組換え酵素の認識配列、例えばloxP配列を挿入する。loxP配列を含むターゲティングベクターには例えば下記GFP等のマーカーを発現させるためのプロモーター配列が含まれる。

（2）RNR2遺伝子座にloxP配列及びGFP遺伝子が挿入されたヒト14番染色体断片

SC20を保持するニワトリDT-40細胞と上記(1)において作製されたニワトリDT-40細胞を全細胞融合し、2種のヒト染色体断片を同時に保持するニワトリDT-40細胞を得る。

(3) 上記(2)で作製されたヒト染色体(断片)を保持するマウスES細胞において部位特異的組換え酵素を発現させる。loxP配列において部位特異的組換えを起こした細胞においては前記プロモーター配列とGFP遺伝子が連結し、GFPが発現する。すなわち転座による組換えヒト染色体を含むニワトリDT-40細胞を選択することができる。

(4) 上記(3)において作製された組換えヒト染色体(断片)をCHO細胞にミクロセル移入する。さらに、得られた組換えヒト染色体(断片)を保持するCHO細胞よりミクロセルを誘導し、そのミクロセルを例えばウシ胎児由来繊維芽細胞と融合する。当該組換えヒト染色体断片を保持するウシ胎児由来繊維芽細胞は例えば組換えヒト染色体上に存在する薬剤耐性マーカーの発現により選択できる。

(5) 上記(4)で得られた当該組換えヒト染色体断片を保持するウシ胎児由来繊維芽細胞をドナー、ウシ未受精卵をレシピエントとした核移植により、当該組換えヒト染色体断片を保持し、発現するウシ個体及びその子孫が作製される(Cibelliら, Science 280:1256, 1998)。

また、本発明において、外来染色体あるいはその断片が移入される、分化多能性を保持する細胞は、前述のES細胞、EC細胞、EG細胞に限られるものではない。例えば、骨髄幹細胞に外来染色体あるいはその断片を移入することが可能であり、該骨髄幹細胞の生体への移植により、遺伝病等の治療を行うことが可能である。

キメラ非ヒト動物において、外来染色体を保持するES細胞がその生殖細胞に分化した場合、生殖により得られる子孫にも導入染色体または断片が認められ、その子孫は導入された染色体または断片上の遺伝子を発現する。

上記のようにして得られるキメラ非ヒト動物またはその子孫を利用して、外来染色体またはその断片上の遺伝子を発現させ、その産物を回収することにより、生物学的に活性な物質を製造することができる。具体的には、キメラ非ヒト動物



またはその子孫の個体を外来染色体またはその断片上の遺伝子を発現しうる条件下で飼育し、その後発現産物を動物の血液、腹水などから回収することができる。あるいはまた、キメラ非ヒト動物またはその子孫の組織、細胞あるいはそれを不死化したもの（例えば、ミエローマ細胞との融合により不死化したハイブリドーマ）などを外来染色体またはその断片上の遺伝子を発現しうる条件下で培養し、その後発現産物を培養物から回収することができる。さらには、これらキメラ非ヒト動物またはその子孫の組織、細胞、あるいはそれを不死化したものから抽出した外来染色体あるいはその断片、または外来染色体またはその断片を構成するDNA、さらにはまた、キメラ非ヒト動物またはその子孫の組織、細胞、あるいはそれを不死化したものに保持された外来染色体あるいはその断片に由来するcDNAを動物細胞あるいは昆虫細胞（例えば、CHO細胞、BHK細胞、肝ガン細胞、ミエローマ細胞、SF9細胞等）に導入し、該細胞を外来染色体またはその断片上の遺伝子を発現しうる条件下で培養し、その後発現産物（例えば、特定の抗原特異的な抗体蛋白質等）を培養物から回収することができる。発現産物は遠心分離などの公知の方法に従って回収することができ、さらに、硫酸分画、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、分取薄層クロマトグラフィーなどの公知の方法に従って精製することができる。生物学的に活性な物質は、外来染色体上にコードされているあらゆる物質を含み、例えば、抗体、特にヒト抗体などを挙げることができる。例えば、得られたキメラ動物の脾細胞あるいはそのハイブリドーマなどの不死化細胞から該染色体上のヒト抗体遺伝子をクローニングし、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）やミエローマ細胞に導入してヒト抗体を生産することができる（Lynette ら, Biotechnology, 10, 1121-, 1992; Bebbingtonら, Biotechnology, 10, 169-, 1992)。

本発明により得られるヒト2番、14番、22番染色体（断片）を保持するキメラマウス及びその子孫は、ヒト抗体重鎖（14番染色体上）、軽鎖 $\kappa$ （2番染色体上）、軽鎖 $\lambda$ （22番染色体上）それぞれの遺伝子の機能的配列の大部分を保持し得る。すなわち、酵母人工染色体等を用いてヒト抗体遺伝子の一部を導入した既知のトランスジェニックマウス（Greenら, Nature Genetics, 7, 13-, 1994, Lo

Lonbergら, Nature, 368, 856-, 1994等)と比較して、ヒトにおいて観察されるものにより近い、非常に多様なヒト抗体レパートリーを発現することが可能である。また、本発明により得られる2番+14番、22番+14番等の染色体(断片)を同時に保持するキメラマウス及びその子孫、並びに、それらを交配することにより得られる2番+14番+22番等の染色体(断片)を同時に保持するマウス及びその子孫は、重鎖、軽鎖の両者がヒト由来である完全なヒト抗体を産生することが可能である。これらのマウスはヒト由来抗原に対してそれを異物とみなして免疫反応を起こし、抗原特異的ヒト抗体を産生することができる。この性質は治療用のヒトモノクローナル抗体、あるいはヒトポリクローナル抗体を得るために非常に有用である(Greenら、前記、Lonbergら、前記)。一方、特定の抗原に対して親和性の高いヒト抗体を得る効率を上げるためには、マウス抗体を産生せず、ヒト抗体のみを産生するマウスを作成することが望まれる(Greenら、前記、Lonbergら、前記)。本発明において、これは典型的には以下の方法AあるいはBにより達成される。

方法A: マウス抗体欠損ES細胞およびマウス抗体欠損キメラ宿主胚を用いる方法。

方法B: ヒト染色体導入キメラマウスよりヒト染色体を保持する子孫を得てマウス抗体遺伝子を欠損するマウス系統との交配を行う方法。

以下にA、Bそれぞれの方法の典型的な例について以下に具体的に記す。

#### 方法Aの具体的手順

1. マウスES細胞に2コピー存在するマウス抗体重鎖遺伝子の片側のアレルを標的遺伝子相同組み換え法(Joynerら, Gene Targeting, 1993, IRL PRESS)を用いて破壊する。遺伝子破壊箇所には後に部位特異的組換えにより除去可能な配列、例えばloxP配列(Creレコンビナーゼにより組み換え、Sauerら、前記、他にFLPレコンビナーゼ-FRT配列を用いたO'Gormanら, Science, 251, 1351-, 1991の例がある)には含まれたG418耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を挿入する。
2. 抗体重鎖遺伝子の片側のアレルが破壊された上記薬剤耐性マウスES細胞を高濃度の薬剤存在下で培養し、高濃度薬剤耐性となった株を選抜する。これらの株をスクリーニングすることにより抗体重鎖遺伝子の両側のアレルが破壊された株が得られる(相沢慎一、前記)。あるいは、抗体重鎖遺伝子の片側のアレルが破壊された上記薬剤耐性マウスES細胞のもう一方の側のアレルの標的遺伝子も相同

組み換え法を用いて破壊する。予め挿入されたマーカー遺伝子とは別のマーカー遺伝子を使用することによって、同様な操作を繰り返すことができる。例えば、G418耐性遺伝子を用いて相同組み換えを行った後、ピューロマイシン耐性遺伝子を用いて相同組み換えを行い、両側のアレルとも抗体重鎖遺伝子が破壊された株を得る。予め挿入されたマーカー遺伝子と同じマーカー遺伝子を使用する場合には、1. で薬剤耐性遺伝子の両側に挿入した組み換え配列の間で、部位特異的組み換え反応を起こす酵素遺伝子を一時的に導入し、標的遺伝子に挿入されていた薬剤耐性遺伝子を除去された薬剤感受性株を選抜する。その後、再度標的遺伝子相同組み換え法によって、マーカー遺伝子を挿入し、両側のアレルとも標的遺伝子が破壊された株を得る（高津聖志ら、実験医学別冊、免疫研究の基礎技術、p. 255-、1995、羊土社）。

3. 2. で得られた抗体重鎖遺伝子の両側のアレルが破壊されたマウスES細胞に1. で薬剤耐性遺伝子の両側に挿入した組換え配列の間で部位特異的組み換え反応を起こす酵素遺伝子、例えばCreレコンビナーゼ遺伝子（Sauerら、前記）を一時的に導入し、loxP配列の間で組み換え反応が起こって両方の抗体重鎖遺伝子に挿入された薬剤耐性遺伝子が除去された薬剤感受性株を選抜する（高津聖志ら、実験医学別冊、免疫研究の基礎技術、p255-、1995、羊土社）。

4. マウス抗体軽鎖 $\kappa$ 遺伝子について上記1～3の過程を繰り返し、最終的に抗体重鎖及び $\kappa$ 鎖を完全に欠損した薬剤感受性株を取得する。

5. 4の株（抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞）を受容細胞としたマイクロセル融合により、薬剤耐性マーカー（例えばG418耐性遺伝子）でマーキングされたヒト抗体重鎖遺伝子を含むヒト14番染色体（断片）を導入する。

6. 5で得られた株を受容細胞としたマイクロセル融合により、5とは異なる薬剤耐性マーカー（例えばピューロマイシン耐性遺伝子）でマーキングされたヒト抗体軽鎖遺伝子を含むヒト2番染色体（断片）あるいは22番染色体（断片）またはその両者を導入する。

7. 自らの抗体を産生することができないマウス系統（例えばRAG-2ノックアウトマウス、Shinkaiら、Cell、68、855-、1992、膜型 $\mu$ 鎖ノックアウトマウス、Kitamuraら、Nature、350、423-、1991）から得た胚を宿主胚として6で得られたE

S細胞とのキメラマウスを作成する。

8. 得られるキメラマウスにおいてほとんどの機能的なBリンパ球はES細胞に由来する（高津聖志ら、実験医学別冊、免疫研究の基礎技術、p234-、羊土社、1995）。このBリンパ球においてはマウス重鎖、 $\kappa$ 鎖が欠損しているため、主として導入染色体上の機能的なヒト抗体遺伝子よりヒトの抗体のみが産生される。

#### 方法Bの具体的手順

1. ヒト抗体重鎖、軽鎖 $\kappa$ または軽鎖 $\lambda$ を含むヒト染色体あるいはその断片を保持するキメラマウスからそれらを安定に保持する継代可能な子孫を得る。

2. 1. で得られたヒト抗体重鎖または軽鎖を発現するマウス系統あるいはそれらの交配により得られたヒト抗体重鎖および軽鎖の両者を発現するマウス系統と自らの抗体遺伝子が欠損しているマウス系統（例えば膜型 $\mu$ 鎖ノックアウトマウス、前記、軽鎖 $\kappa$ ノックアウトマウス、Chenら、EMBO J., 3, 821-, 1993）との交配により、マウス抗体重鎖、及び軽鎖 $\kappa$ の欠損についてホモ接合体であり、なおかつヒト抗体重鎖（14番）＋軽鎖 $\kappa$ （2番）、抗体重鎖（14番）＋軽鎖 $\lambda$ （22番）あるいはヒト抗体重鎖（14番）＋軽鎖 $\kappa$ （2番）＋軽鎖 $\lambda$ （22番）を含むヒト染色体を保持するマウス系統を得る。このマウス系統においてはマウス抗体重鎖、軽鎖 $\kappa$ 遺伝子が欠損しているため、主として導入染色体上の機能的なヒト抗体遺伝子よりヒトの抗体のみが産生される。

なお、上記のAおよびBの方法は、ヒト抗体のみならず、外来染色体上に存在するあらゆる遺伝子の産物を効率的に得るために、用いることができる。

以下に実施例を示して具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものでない。

(実施例 1) G418耐性標識されたヒト染色体 (断片) を保持する染色体供与細胞の作製

G418耐性遺伝子を含むプラスミド pSTneoB (Katohら、Cell Struct. Funct., 12:575, 1987; Japanese Collection of Research Biologicals (JCRB), Deposit Number: VE039) を制限酵素 Sall (宝酒造) で線状化し、ヒト正常繊維芽細胞 HFL-1 (RIKEN Cell Bankより入手、RCB0251) へ導入した。HFL-1細胞をトリプシン処理し、 $5 \times 10^6$  個/ml となるようにダルベッコのリン酸バッファー (PBS) に懸濁してから  $10 \mu\text{gDNA}$  存在下でジーンパルサー (バイオラッド) を用いてエレクトロポレーションを行なった (石田ら、細胞工学実験操作入門、講談社、1992)。25  $\mu\text{F}$  の容量で 1000V の電圧を 4mm 長のエレクトロポレーションセル (165-2088、バイオラッド) を用いて室温で印加した。エレクトロポレーションした細胞を 15% 牛胎児血清 (FBS) を添加したイーグル F12 培地 (以下 F12、という) を含む 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (コーニング) 3 ~ 6 枚に播種した。1 日後に 200  $\mu\text{g/ml}$  の G418 (GENETICIN, シグマ) を含む 15% FBS を添加した F12 培地と置き換えた。2 ~ 3 週間後に生じたコロニー 100 個程度を一つの集団として 52 グループにそれぞれまとめ、100 mm シャーレに再び播種し培養した。

マウス A9 細胞 (Oshimura, Environ. Health Perspect., 93:57, 1991, JCRB0211) を 10% 牛胎児血清 (FBS) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (以下 DMEM、という) 中、100 mm シャーレで培養した。52 グループの G418 耐性 HFL-1 細胞を 15% 牛胎児血清 (FBS) と 200  $\mu\text{g/ml}$  の G418 を添加した F12 中で、それぞれ 100mm シャーレで培養した。マウス A9 細胞と HFL-1 細胞をトリプシン処理後それぞれ四分の一から半分量ずつ混合し、100mm シャーレに播種し 10% 牛胎児血清 (FBS) を添加した DMEM と 15% 牛胎児血清 (FBS) を添加した F12 との等量混合物中で半日から一日培養した。細胞融合は (清水ら、細胞工学ハンドブック、羊土社、p. 127-, 1992) に記述されている方法に従った。DMEM で細胞表面を 2 回洗った後、2ml の PEG (1 : 1.4) 溶液で 1 分間処理し、さらに、2ml の PEG (1 : 3) 溶

液に換え1分間処理した。PEG溶液を吸い取り、無血清培地 (DMEM) で3回洗った後、通常の培地 (10% FBS、DMEM) で1日間培養した。細胞をトリプシン処理により分散し、ウワバイン ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ , シグマ) およびG418 ( $800 \mu\text{g/ml}$ ) を含む二重選択培地 (10% FBS、DMEM) に懸濁し、100mmシャーレ3枚に播種した。約3週間培養した後、生じたコロニーをトリプシン処理により細胞を分散しG418 ( $800 \mu\text{g/ml}$ ) を含む選択培地 (10% FBS、DMEM) で培養した。

トリプシン処理により細胞を分散し2グループを一つにまとめて、6本の25cm<sup>2</sup>遠心用フラスコ (コースター、3025) にて細胞密度が70~80%飽和程度まで培養した。コルセミド ( $0.05 \mu\text{g/ml}$ , デメコルシン, 和光純薬) を含む培養液 (20% FBS、DMEM) に交換し、2日間培養しマイクロセルを形成させた。培養液を除去し、予め保温 (37℃) しておいたサイトカラシンB ( $10 \mu\text{g/ml}$ , シグマ) 溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル製遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、34℃、8000rpm、1時間の遠心を行なった。マイクロセルを無血清培地に懸濁し、フィルターで濾過し精製した。マウスA9細胞を80%飽和の状態まで培養した25cm<sup>2</sup> フラスコに精製した微小核を加えPEG溶液で融合させた。G418を含む選択培地で培養しコロニーを単離した。各クローンが保持するヒト染色体 (2番、4番、14番、22番) は以下の通り同定した。上記以外のすべての実験操作及び試薬等はく清水ら、細胞工学ハンドブック、羊土社、p. 127-〉に従った。

#### (1) PCR解析

単離した細胞を培養し、細胞からPuregene DNA Isolation kit (Gentra System社) を用いてゲノムDNAを抽出し、このゲノムDNAを鋳型とし、ヒト染色体特異的なプライマーを用いてPCR法で2、4、14、22番ヒト染色体を保持するクローンを選抜した。PCR増幅は約0.1  $\mu\text{g}$  のゲノムDNAを使用し (Innisら, PCR実験マニュアル, HBJ出版局, 1991, サーマルサイクラーはGeneAmp 9600, Perkin-Elmer社を使用) に従い行なった。TaqポリメラーゼはPerkin-Elmer社製を用い、反応条件は、94℃ 5分を1サイクル行なった後、変性94℃ 15秒、アニーリング54~57℃ 15秒 (プライマーにより適宜変更)、伸長72℃ 20秒を35サイクル行なった。プライマーは各染色体上に存在する遺伝子 (O'Brien, Genetic Maps, 6th edition, Book 5, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993) 及び多型性

マーカー (Polymorphic STS Primer Pair, BIOS 社; Weissenbach ら, Nature 359:794, 1992; Walterら, Nature Genetics, 7:22, 1994 等) を用いた。遺伝子プライマーはGenBank、EMBL等のデータベースより入手した塩基配列をもとに作製した。多型性プライマーの名称及び、遺伝子プライマーの配列はそれぞれの染色体について以下の実施例で示した (2番: 実施例 1、4番: 実施例 6、14番: 実施例 9、22番: 実施例 2)。2番染色体の同定には以下に示す遺伝子マーカー及び多型性マーカー (Polymorphic STS Primer Pair, BIOS社: D2S207, D2S177, D2S156, D2S159 BIOS社) を用いた。

C $\kappa$  (immunoglobulin kappa constant) : 5'-TGGAAGGTGGATAACGCCCT (配列番号 1), 5'-TCATTCTCCTCCAACATTAGCA (配列番号 2)

FABP1 (fatty acid binding protein-1 liver) : 5'-GCAATCGGTCTGCCGGAAGA (配列番号 3), 5'-TTGGATCACTTTGGACCCAG (配列番号 4)

Vk3-2 (immunoglobulin kappa variable) : 5'-CTCTCCTGCAGGGCCAGTCA (配列番号 5), 5'-TGCTGATGGTGAGAGTGAAGTC (配列番号 6)

Vk1-2 (immunoglobulin kappa variable) : 5'-AGTCAGGGCATTAGCAGTGC (配列番号 7), 5'-GCTGCTGATGGTGAGAGTGA (配列番号 8)

## (2) フルオレッセンス インサイチュールハイブリダイゼーション (FISH)

FISH解析は (松原ら, FISH実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記された方法に従い、ヒト 2 番、4 番、14 番、22 番染色体特異的プローブ (CHROMOSOME PAINTING SYSTEM, Cambio社) を用いて行なった。

例えば、2 番染色体を保持するクローンは 26 グループ (745 クローン) 中 10 グループに 1 個以上のクローンを得た。このうち用いた 2 番染色体特異的なプライマーすべてに陽性であったのは 5 クローンだった。これらのクローンを FISH 解析した。FISH 解析は (松原ら, FISH 実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記された方法に従い、ヒト 2 番染色体特異的プローブ (CHROMOSOME PAINTING SYSTEM, CANBIO社) を用いて行なった。すべてのプライマーに陽性な細胞ではヒト 2 番染色体がほぼ完全な形で観察され、一部のプライマーのみ陽性なクローンのうちいくつかのクローンではヒト 2 番染色体よりも小さな独立染色体が観察され、あるいは

ヒト 2 番染色体以外の染色体と融合しているような形の染色体を持つ細胞も観察された（図 1）。図 1 において、横列がクローン名、縦列は PCR に使用したプライマーを示す。○は陽性を、×は陰性を示した。また、FISH により観察されたヒト 2 番染色体の存在形態を最下行に示した。記載のないものは実施していない。

同様にして、ヒト 4 番、14 番、22 番染色体を保持する A9 細胞を得た。

#### （実施例 2）マウス ES 細胞へのマイクロセル法によるヒト 22 番染色体導入

染色体供与細胞として、（実施例 1）で得られたヒト 22 番染色体を保持するマウス A9 細胞株（以下 A9/#22、という）を用いた。染色体受容細胞としてはマウス ES 細胞株 E14（Martin L. Hooper より入手、Hooper ら、Nature, 326 :292, 1987）を用いた。E14 の培養法は〈相沢 慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲットィング、羊土社、1995〉に記された方法に従い、栄養細胞としては、マイトマイシン C（シグマ）処理した G418 耐性 ST0 細胞株（大阪大学、近藤寿人教授より入手）を用いた。まず清水ら（細胞工学ハンドブック、羊土社、1992）の報告した方法に従い、約  $10^8$  個の A9/#22 からマイクロセルを調製した。得られたマイクロセルは全量を 5ml の DMEM に懸濁した。約  $10^7$  個の E14 をトリプシンで分散させた後、DMEM で 3 回洗浄し、5ml の DMEM に懸濁した後、マイクロセルとあわせ、1250rpm、10 分間遠心して上清を除いた。沈殿をタッピングによりよくほぐし、1:1.4 PEG 溶液（5g PEG1000、〈和光純薬〉、1 ml DMSO〈シグマ〉を 6ml DMEM に溶解）0.5ml を加えて室温で 1 分 30 秒静置した後、10ml の DMEM をゆっくりと加えた。直ちに 1250rpm、10 分間遠心して上清を除き、沈殿を 30ml の ES 細胞用培地に懸濁し、あらかじめ栄養細胞をまいた直径 100mm の組織培養用プラスチックシャーレ（コーニング）3 枚に播種した。24 時間後に  $300 \mu\text{g/ml}$  の G418（GENETICIN、シグマ）を加えた培地と交換し、その後毎日培地交換を行なった。1 週間～10 日後には薬剤耐性コロニーが出現する。その出現頻度は E14 細胞  $10^7$  個あたり 0～5 個であった。そのコロニーをピックアップし増殖させ、 $5 \times 10^6$  個あたり 1ml の保存用培地（ES 細胞用培地 + 10% DMSO〈シグマ〉）に懸濁し、 $-80^\circ\text{C}$  にて凍結保存した。同時に各薬剤耐性株について  $10^6 \sim 10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kit（Gentra System 社）により調製した。



ヒト22番染色体の断片化はマイクロセルにガンマ線照射することにより行なった (Koiら, Science, 260:361, 1993)。約 $10^8$ 個のA9/#22より取得したマイクロセルを5mlのDMEMに懸濁し、ガンマセル40 (カナダ原子力公社製) により、氷上で60Gyのガンマ線を照射した (1.2Gy/分×50分)。ガンマ線照射したマイクロセルは未照射マイクロセルと同様に融合、薬剤耐性株選抜を行なった結果、薬剤耐性株の出現頻度はE14細胞 $10^7$ 個あたり1～7個であった。薬剤耐性株については未照射の場合と同様にして凍結保存、DNA取得を行なった。

未照射マイクロセル薬剤耐性株E14/#22-9、E14/#22-10、ガンマ線照射マイクロセル薬剤耐性株E14/#22-14、E14/#22-25における導入染色体の保持は以下の(1)～(3)により確認した。

(1) PCR解析 (図2)

薬剤耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト22番染色体上に存在する遺伝子 (Genetic Maps, 前記) 及び多型性マーカー (Polymorphic STS Primer Pair, BIOS社: D22S315, D22S275, D22S278, D22S272, D22S274; Nature 359:794, 1992) の存在をPCR法により検出した。GenBank、EMBL等のデータベースより入手した塩基配列をもとに作製した遺伝子プライマーオリゴヌクレオチドの配列を記す。

PVALB (parvalbumin) : 5'-TG GTGGCTGAAAGCTAAGAA (配列番号9), 5'-CCAGAA GAATGGTGTCATTA (配列番号10)

MB (myoglobin) : 5'-TCCAGGTTCTGCAGAGCAAG (配列番号11), 5'-TG TAGTTGGAGG CCATGTCC (配列番号12)

DIA1 (cytochrome b-5 reductase) : 5'-CCCCACCCATGATCCAGTAC (配列番号13), 5'-GCCCTCAGAAGACGAAGCAG (配列番号14)

Ig  $\lambda$  (immunoglobulin lambda) : 5'-GAGAGTTGCAGAAGGGGTGACT (配列番号15), 5'-GGAGACCACCAAACCCTCCAAA (配列番号16)

ARSA (arylsulfatase A) : 5'-GGCTATGGGGACCTGGGCTG (配列番号17), 5'-CAGA GACACAGGCACGTAGAAG (配列番号18)

約0.1  $\mu$ gのゲノムDNAを鋳型として上記の10種のプライマーについてPCR増幅 (Innisら, 前記) を行なった。その結果、未照射の2株は全てのプライマー、

ガンマ線照射した2株については一部のプライマーについて期待される長さの増幅産物が検出された。以上の結果を図2に示す。図2において、左側にヒト22番染色体のGバンド像に基づく模式的な染色体地図、また、位置が明らかになっているいくつかのマーカーについてはどのバンドに位置するかを示した(O'Brien, GENETIC MAPS, 6th edition, BOOK 5等)。遺伝子及び多型性マーカーの並び方は、現在までに入手出来る情報(Science, HUMAN GENETIC MAP, 1994, Nature Genetics, 7:22, 1994, Nature 359:794, 1992等)を基に、大まかな位置関係を示したもので、順序は必ずしも正確ではない。4種のG418耐性E14細胞株について、PCRにより期待される増幅産物が検出されたマーカーは■で、検出されなかったマーカーを□で示した。下側にはFISH解析による観察結果を示した。A9/#22は、染色体供与細胞である。

## (2) サザンブロット解析

サザンブロット解析はヒト特異的な繰り返し配列であるL1配列(ハプロイドゲノム当たり $10^4 \sim 10^5$ コピー存在、RIKEN DNA Bankより入手、Nucleic acids research, 13;7813, 1985, pUK19A由来1.4kb EcoRI-BamHI断片)をプローブとして、制限酵素(BglIII、宝酒造製)処理を行なった約 $2 \mu\text{g}$ のゲノムDNAに対してAusubelら, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994>に記された方法に従い行なった。その結果、各薬剤耐性株DNAにおいてヒトL1配列とハイブリダイズするバンドが多数検出された。未照射の2株についてはそのパターン及び、各バンドの濃度から推定できるヒト染色体DNAのマウスゲノムDNAに対する量比はA9/#22のそれと同等であった。ガンマ線照射株の全体のシグナル強度はA9/#22と比較した場合、PCR解析で示された欠失の程度と相関していた。

## (3) フルオレッセンスインサイチュウハイブリダイゼーション(FISH)

FISH解析は(松原ら, FISH実験プロトコール, 秀潤社, 1994)に記された方法に従い、ヒト22番染色体特異的プローブ(CHROMOSOME PAINTING SYSTEM, Cambio社)を用いて行なった。その結果、観察した分裂像のほとんどにおいて、E14/#22-9はマウス染色体に転座した形で、他の3株は独立した染色体としてヒト22番染色体が検出された。

以上の実験により、得られたG418耐性株E14/#22-9、E14/#22-10 はヒト22番染色体の全てあるいは大部分を、E14/#22-14、E14/#22-25 はその部分断片を保持することが確かめられた。

（実施例3）ヒト22番染色体を保持するES細胞からのキメラマウス作製

一般的なマウス胚取得、培養、ES細胞の胚への注入、仮親子宮への移植等の手技については、〈相沢慎一，バイオマニュアルシリーズ8，ジーンターゲティング，羊土社，1995〉に記された方法に従った。（実施例2）で得られ、ヒト22番染色体を保持していることが確認されたG418耐性ES細胞株E14/#22-9を凍結ストックより立ち上げ、C57BL/6×C3H F1雌マウス（日本クレア社）をC3H雄マウス（日本クレア社）と交配することにより取得した胚盤胞期胚に胚あたり10～15個注入した。偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス（日本クレア社）の子宮に片側の子宮あたり約10個のES細胞注入胚を移植した。その結果を（表1）に示す。

表1. ヒト22番染色体（断片）を保持するE14細胞株からのキメラマウス作製

ES細胞株/ ヒト染色体	G418耐性 株番号	ES細胞を注入し た胚盤胞期胚数	子マウス の数	キメラマウス の数	毛色への貢献率		
					～10%	10-30%	30%～
E14/#22	9	166	29	16	7	3	6

計166個の注入胚を移植した結果29匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚由来の野生色（濃茶）の中にE14細胞由来の薄灰色が認められるかどうかにより判定される。誕生した29匹のうち毛色に明らかに薄灰色の部分のある、すなわち、E14細胞の貢献の認められる個体は16匹であった。また、最高の貢献率はK22-22における約40%であった。

この結果より、ヒト22番染色体を保持するマウスES細胞株E14/#22-9はキメラ形成能、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確

認された。

(実施例4) ヒト22番染色体を保持するES細胞由来キメラマウス各組織におけるヒト染色体DNAの保持確認

(実施例3)の毛色による判定に加えて、尻尾より調製したゲノムDNAを鋳型としたPCR解析により、導入染色体の保持を確認した。誕生後3週以上を経たキメラマウスから<勝木元也, 発生工学実験マニュアル, 講談社サイエンティフィク, 1987>に記された方法に従い尻尾を取得し、Puregene DNA Isolation Kitを用いてゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型として(実施例2)で用いた多型性プライマーのうちPVALB、D22S278を用いて増幅産物の確認を行った。毛色に貢献の見られた個体のうち10匹について解析を行った結果、全ての個体において少なくともいずれかのプライマーによる増幅産物が確認された。

サザン解析は(実施例2)と同様に、ヒトL1配列をプローブとして用い、6個体のキメラマウス、1個体の非キメラマウスの2  $\mu$ gの尻尾ゲノムDNAに対して行なった。その結果、全てのキメラ個体において多数のヒトL1配列の存在が認められ、そのパターンはE14/#22-9と類似していた。マウスゲノムに対する量比は最も多いもので10%程度であった(図3)。図3において、各レーンとも、BglI消化した2  $\mu$ gのゲノムDNAを使用した。<sup>32</sup>P標識ヒトL1配列をプローブとし、シグナルはイメージアナライザーBAS2000(富士写真フイルム社)により検出された。右より、キメラマウス(K22-6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 : 9は非キメラ)の尻尾由来ゲノムDNAおよびコントロールDNA(C: Cは、E14/#22-9とE14ゲノムDNAを1:9の重量比で混合したもの)のレーンである。左側にDNA分子量、右側に各キメラ個体のキメラ率を示した。(- : 0%、+ : ~10%、++ : 10~30%)

さらに、毛色に5%程度の貢献の見られたキメラ個体(K22-7)について脳、肝臓、筋肉、心臓、脾臓、胸腺、卵巣、腎臓からISOGEN(ニッポンジーン社)によりゲノムDNAを取得し、それぞれの組織について、(実施例2)で使用了遺伝子プライマーのうちMB、D1A1を用いてPCR解析を行なった。その結果2つのプライマーとも全ての組織において期待される増幅産物が確認された。D1A1プライマーによる結果を(図4)に示す。PCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動した

後、臭化エチジウム染色して検出した。図4の各レーンは左からB：脳、L：肝臓、SM：骨格筋、H：心臓、Sp：脾臓、Th：胸腺、Ov：卵巣、K：腎臓、nc：非キメラマウス尻尾DNA(陰性コントロール)、pc：ヒト繊維芽細胞(HFL-1) DNA(陽性コントロール)を示す。

これらの結果より、E14/#22-9はマウス個体において種々の正常組織に貢献し、かつヒト22番染色体を保持していることが確かめられた。

(実施例5) ヒト22番染色体を保持するES細胞由来キメラマウスにおけるヒト遺伝子の発現

ヒト遺伝子発現確認のための試料としては、毛色に5%程度の貢献の見られた個体(K22-7)の尻尾を液体窒素にて凍結後粉碎したものを用いた。これは皮膚、骨、筋肉、血液等の組織の混合したものである。これよりISOGEN(ニッポンジー)を使用して総RNAを抽出し、RT-PCR法により、ヒト-ミオグロビン(MB)、ヒト-チトクローム b5 レダクターゼ(DIA1)のmRNAの検出を行なった。RT-PCRは<Innisら, PCR実験マニュアル, HBJ出版局, 1991>に記された方法に従って行なった。逆転写反応用プライマーは、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド(終濃度100pmol、宝酒造製)を、逆転写酵素はBRL社製(スーパースクリプト)を使用した。cDNAを鋳型とした増幅に用いたプライマーを記す。

MB: 5'-TTAAGGGTCACCCAGAGACT (配列番号19), 5'-TGTAGTTGGAGGCCATGTCC (配列番号20)

DIA1: 5'-CAAAAAGTCCAACCCTATCA (配列番号21), 5'-GCCCTCAGAAGACGAAGCAG (配列番号22)

その結果、両遺伝子のmRNAに特異的な増幅産物が検出された(図5)。RT-PCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動した後、臭化エチジウム染色して検出した。図5において、Mはマーカー(HindIII消化λ DNA+HaeIII消化φX174DNA, 宝酒造)、MBはヒトミオグロビン、DIA1はヒトチトクロームb5レダクターゼ、WTは野生型C3Hマウスを示す。

さらに同じ個体(K22-7)について、脳、心臓、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、卵巣、骨格筋からISOGENを使用して総RNAを抽出し、上記の2種のプライマーにより各臓器のRT-PCRを行った。その結果、DIA1は全ての臓器で、MBは心臓と骨格筋のみで期待される増幅産物が確認された(図6)。ミオグロビンは筋細胞特異的に発現することが知られており(Bassel-Dubyら, MCB, 12:5024, 1992)、この結果は導入したヒト染色体上の遺伝子がマウス個体で正常な組織特異的発現制御を受け得ることを示している。PCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動した後、臭化エチジウム染色して検出した。図6において、各レーンは左からB:脳、H:心臓、Th:胸腺、L:肝臓、Sp:脾臓、K:腎臓、Ov:卵巣、SM:骨格筋、M:マーカー(上

記)を示す。MBの結果において観察される下方のバンドは非特異的産物と考えられる。

すなわち、導入されたヒト22番染色体はキメラマウスの正常組織において機能し得ることが確かめられた。

(実施例6) ヒト4番染色体またはその部分断片のES細胞への導入

染色体供与細胞として、(実施例1)で得られたヒト4番染色体を保持するマウスA9細胞株(以下A9/#4、という)を用いた。染色体受容細胞としてはマウスES細胞株E14(実施例2と同様)を用いた。マイクロセル融合実験およびG418耐性株の選択は(実施例2)と同様に行なった。薬剤耐性株の出現頻度はE14細胞10<sup>7</sup>個あたり1~2個であった。薬剤耐性株の凍結保存、ゲノムDNA取得は(実施例2)と同様に行なった。薬剤耐性株E14/#4-4、E14/#4-7、E14#4-11におけるヒト4番染色体またはその断片の保持は以下の(1)~(3)により確認した。

(1) PCR解析(図7)

薬剤耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト4番染色体上に存在する遺伝子(O'Brien, Genetic Maps, 6th edition, Book 5, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993)及び多型性マーカー(Polymorphic STS Primer Pair BIOS社: D4S395, D4S412, D4S422, D4S413, D4S418, D4S426, F11; Nature 359:794, 1992)の存在をPCR法により検出した。GenBank、EMBL等のデータベースより入手した塩基配列をもとに作製した遺伝子プライマーオリゴヌクレオチドの配列を記す。

HD(huntington disease): 5'-TCGTTCTGTCGAGGATGAA(配列番号23), 5'-TCAC TCCGAAGCTGCCTTTC(配列番号24)

IL-2(interleukin-2): 5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTG(配列番号25), 5'-TCATCT GTAAATCCAGCAGT(配列番号26)

KIT(c-kit): 5'-GATCCCATCGCAGCTACCGC(配列番号27), 5'-TTCGCCGAGTAGTC GCACGG(配列番号28)

FABP2(fatty acid binding protein 2, intestinal): 5'-GATGAACTAGTCCAG GTGAGTT(配列番号29), 5'-CCTTTTGGCTTCTACTCCTTCA(配列番号30)

上記の11種のプライマーについてPCR増幅を行なった結果、3株共に、全て、

あるいは一部のプライマーについて期待される増幅産物が確認された。E14/#4-4、E14/#4-7株のように一部領域に欠失がみられるものもあった。以上の結果を図7に示す。図7において、左側にヒト4番染色体のGバンド像に基づく模式的な染色体地図、また、位置が明らかになっているいくつかのマーカーについてはどのバンドに位置するかを示した（実施例2参照）。遺伝子及び多型性マーカーの並び方は、現在までに入手出来る情報（実施例2参照）を基に、大まかな位置関係を示したもので、順序は必ずしも正確ではない。3種のG418耐性E14細胞株について、PCRにより期待される増幅産物が検出されたマーカーは■で、検出されなかったマーカーを□で示した。下側にはFISH解析による観察結果を示した。A9/#4は染色体供与細胞を示す。

## (2) サザンブロット解析（図8）

サザンブロット解析は（実施例2）と同様に、E14/#4-4、E14/#4-7より取得したゲノムDNAについてヒトL1配列をプローブとして行なった。その結果、両株DNAにおいてヒトL1配列とハイブリダイズするバンドが多数検出された。A9/#4と比較して、全体のシグナル強度はPCR解析で示された欠失の程度と相関していた。図8において、各レーンとも、BglIII消化した2  $\mu$ gのゲノムDNAを使用した。<sup>32</sup>P標識ヒトL1配列をプローブとし、シグナルはイメージアナライザーBAS2000（富士写真フイルム社）により検出した。図8において、各レーンは、左から、1:A9/#4（染色体供与細胞）、2:A9/#4+A9（1:2）、3:A9/#4+A9（1:9）、4:A9、5:E14/#4-7、6:E14/#4-4を示す。2、3は2種のDNAを括弧内に示した比率で混合したものである。左側にDNA分子量を示した。

## (3) フルオレッセンスインサイチューハイブリダイゼーション（FISH）

FISH解析は（実施例2）と同様に、ヒト4番染色体特異的プローブ（CHROMOSOME PAINTING SYSTEM, Cambio社）を用いて行なった。その結果、3株すべてのほとんどの分裂像において、ヒト4番染色体あるいはその部分断片が検出された。E14/#4-4はマウス染色体に転座した形で、他の2株は独立した染色体として存在していた。観察されるヒト染色体の相対的な大きさは、PCR解析の結果から推測されるそれと一致していた。

以上の実験により、得られたG418耐性株はヒト4番染色体の全てあるいはその



部分断片を保持することが明かとなった。

（実施例 7） ヒト 4 番染色体部分断片を保持する ES 細胞からのキメラマウス作製

ヒト 4 番染色体部分断片を保持していることが確認された G418 耐性 ES 細胞株 E14/#4-4、E14/#4-7 を凍結ストックより立ち上げ、（実施例 3）と同様にして取得した胚盤胞期胚に胚あたり 10～15 個注入した。偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 ICR マウス（日本クレア社）の子宮に片側の子宮あたり約 10 個の ES 細胞注入胚を移植した。その結果を（表 2）に示す。

表 2. ヒト 4 番染色体（断片）を保持する E14 細胞株からのキメラマウス作製

ES 細胞株 / ヒト染色体	G418 耐性 株番号	ES 細胞を注入し た胚盤胞期胚数	子マウス の数	キメラマウス の数	毛色への貢献率		
					～10%	10-30%	30%～
E14/#4	4	160	8	5	5	-	-
	7	80	5	2	1	1	-

計 240 個の注入胚を移植した結果 13 匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚由来の野生色（濃茶）の中に E14 細胞由来の薄灰色が認められるかどうかにより判定される。誕生した 13 匹のうち毛色に明らかに薄灰色の部分のある、すなわち、E14 細胞の貢献の認められる個体は 7 匹であった。また、最高の貢献率は E14/#4-7 由来の 1 個体において約 15% であった。

この結果より、ヒト 4 番染色体部分断片を保持するマウス ES 細胞株 E14/#4-4、E14/#4-7 はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

（実施例 8） ヒト 4 番染色体部分断片を保持する ES 細胞由来キメラマウスにおけるヒト染色体 DNA の保持及び、G418 耐性遺伝子の発現確認

## (1) PCR解析

(実施例7) で得られたキメラマウスのうちE14/#4-7由来の1個体 (K#4-7-1 : キメラ率約5%)、E14/#4-4由来の1個体 (K#4-4-41 : キメラ率約5%) について(実施例4)と同様に尻尾よりゲノムDNAを調製した。それを鋳型とし、(実施例6)で示した4番染色体解析用プライマーのうちE14/#4-7、E14/#4-4で検出された多型性マーカーF11についてPCR解析を行なった。その結果、2個体とも期待される増幅産物が検出された。

## (2) サザン解析 (図9)

サザン解析は(実施例2)と同様、E14/#4-7由来の1個体 (K#4-7-1 : キメラ率約5%) についてヒトL1配列をプローブとして用い、2  $\mu$ gの尻尾由来ゲノムDNAに対して行なった。その結果、多数のヒトL1配列の存在が認められ、そのパターンはE14/#4-7と類似していた。マウスゲノムに対する量比はE14/#4-7の約10%程度であった。図9において、各レーンとも、Bg111消化した2  $\mu$ gの尻尾由来ゲノムDNAを使用した。<sup>32</sup>P標識ヒトL1配列をプローブとし、シグナルはイメージアナライザーBAS2000 (富士写真フイルム社) により検出した。左側にDNA分子量を示した。各レーンは左から1 : K#4-7-1、2 : ブランク、3 : E14/#4-7を示す。

## (3) 尻尾由来繊維芽細胞のG418耐性試験

キメラマウスのうち、E14/#4-7由来の1個体 (K#4-7-1 : キメラ率約5%)、E14/#4-4由来の1個体 (K#4-4-41 : キメラ率約5%) について尻尾から以下のように繊維芽細胞を調製した。DNA調製(実施例4)と同様にキメラマウスの尻尾を5mm~10mm切断し、PBS/1mM EDTAで数回洗浄した後、メスで切れ込みをいれて表皮を除去し、内部の組織をメスで細かく切り刻む。組織細片を5mlのPBS/1mM EDTAをいれたチューブに移し、30分~1時間室温静置する。その後、1mlのPBS/EDTAを残して上清を取り除き、1mlの0.25%トリプシン/PBSを加え、5~10分間室温でタッピングあるいはピペッティングしながら組織をよくほぐす。1000rpm, 10分間遠心し、沈殿を2mlのDMEM (10%FCS) に懸濁し、35mmシャーレに播種する。7~10日の培養後、トリプシン処理により細胞をシャーレからはがし、シャーレあたり約 $10^4$ 個の細胞を35mmシャーレ2枚に播種し、うち1枚に終濃度400  $\mu$ g/

mlのG418を加え、5～7日間培養し、それぞれのシャーレの生細胞を観察する。この条件で、野生型ICRマウス由来の繊維芽細胞は、G418存在下ではほぼ100%死滅する。この結果、2個体共G418耐性の繊維芽細胞の存在が認められた。

これらの結果より、E14/#4-7、E14/#4-4はマウス個体において種々の正常組織に貢献し、かつヒト4番染色体部分断片を保持していることが確認された。

（実施例9）マウスES細胞へのヒト14番染色体またはその断片の導入

染色体供与細胞として、（実施例1）で得られたヒト14番染色体を保持するマウスA9細胞株（以下A9/#14、という）を用いた。染色体受容細胞としてはマウスES細胞株TT2（ライフテックオリエンタル社より購入、Yagiら, Analytical Biochem., 214:70, 1993）を用いた。TT2の培養法は<相沢慎一, バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲットィング, 羊土社, 1995>に記された方法に従い、栄養細胞はマイトマイシンC（シグマ）処理したG418耐性初代培養細胞（ライフテックオリエンタル社より購入）を用いた。マイクロセル融合実験およびG418耐性株の選択は（実施例2）と同様に行なった。薬剤耐性株の出現頻度はTT2細胞 $10^7$ 個あたり3～6個であった。薬剤耐性株の凍結保存、ゲノムDNA取得は（実施例2）と同様に行なった。

ヒト14番染色体の断片化はマイクロセルにガンマ線照射することにより行なった（Koiら, Science, 260:361, 1993）。約 $10^8$ 個のA9/#14より取得したマイクロセルを5mlのDMEMに懸濁し、ガンマセル40（前記）により、氷上で30Gyのガンマ線を照射した（1.2Gy/分×25分）。ガンマ線照射したマイクロセルを未照射マイクロセルと同様に融合、薬剤耐性株選抜を行なった結果、薬剤耐性株の出現頻度はTT2細胞 $10^7$ 個あたり3個であった。薬剤耐性株については（実施例2）と同様にして凍結保存、DNA取得を行なった。

ガンマ線未照射マイクロセル移入によるG418耐性株1-4、1-5、ガンマ線（30Gy）照射マイクロセル移入によるG418耐性株3-1、3-2計4株におけるヒト14番染色体または部分断片の保持は以下の（1）、（2）により確認した。

#### （1）PCR解析（図10）

薬剤耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト14番染色体上に存在する遺伝子（O' Br

ien, Genetic Maps, 6th edition, Book 5, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993) 及び多型性マーカー (Polymorphic STS Primer Pair BIOS社: D14S43, D14S51, D14S62, D14S65, D14S66, D14S67, D14S72, D14S75, D14S78, D14S81, PCI; Nature 359:794, 1992; Nature Genetics, 7:22, 1994) の存在をPCR法により検出した。GenBank、EMBL等のデータベースより入手した塩基配列をもとに作製した遺伝子プライマーオリゴヌクレオチドの配列を記す。

NP (nucleoside phosphorylase) : 5'-ATAGAGGGTACCCACTCTGG (配列番号31),

5'-AACCAGGTAGGTTGATATGG (配列番号32)

TCRA (T-cell receptor alpha) : 5'-AAGTTCCTGTGATGTCAAGC (配列番号33),

5'-TCATGAGCAGATTAAACCCG (配列番号34)

MYH6 (myosin heavy chain cardiac) : 5'-TGTGAAGGAGGACCAGGTGT (配列番号35), 5'-TGTAGGGGTTGACAGTGACA (配列番号36)

IGA2 (immunoglobulin alpha-2 constant) : 5'-CTGAGAGATGCCTCTGGTGC (配列番号37), 5'-GGCGGTTAGTGGGGTCTTCA (配列番号38)

IGG1 (immunoglobulin gamma-1 constant) : 5'-GGTGTCTGTGGAAGTCAGGCCG (配列番号39), 5'-CTGGTGCAGGACGGTGAGGA (配列番号40)

IGM (immunoglobulin mu constant) : 5'-GCATCCTGACCGTGTCCGAA (配列番号41), 5'-GGGTCAGTAGCAGGTGCCAG (配列番号42)

IGVH3 (immunoglobulin heavy variable-3) : 5'-AGTGAGATAAGCAGTGGATG (配列番号43), 5'-GTTGTGCTACTCCCATCACT (配列番号44)

薬剤耐性株4株のゲノムDNAを鋳型として、上記の18種のプライマーについて(実施例2)同様にPCR増幅を行なった結果、全て、あるいは一部のプライマーについて期待される増幅産物が確認された。ガンマ線照射したマイクロセルを用いて得られた薬剤耐性株3-1、3-2は、14番染色体の一部領域を欠失している傾向が認められた。また、未照射マイクロセルを用いた場合でも1-4株のごとく欠失がみられるものもあった。以上の結果を図10に示す。図10において、左側にヒト14番染色体のGバンド像に基づく模式的な染色体地図、また、位置が明らかになっているいくつかのマーカーについてはどのバンドに位置するかを示した(実施例2参照)。遺伝子及び多型性マーカーの並び方は、現在までに入手出来る情報

(実施例 2 参照) を基に、大まかな位置関係を示したもので、順序は必ずしも正確ではない。4 種の G418 耐性 TT2 細胞株について、PCR により期待される増幅産物が検出されたマーカーは■で、検出されなかったマーカーを□で示した。A9/14 は染色体供与細胞である。右端には実施例 11 (1) の結果が示されている。

(2) フルオレッセンスインサイチュウハイブリダイゼーション (FISH)

FISH 解析は (松原ら, FISH 実験プロトコル、秀潤社、1994) に記された方法に従い、ヒト 14 番染色体特異的プローブ (CHROMOSOME PAINTING SYSTEM, Cambio 社) を用いて行なった。その結果、4 株すべてについてほとんどの分裂像に、ヒト 14 番染色体あるいはその部分断片が、独立した染色体として観察された。観察されるヒト染色体の相対的な大きさは、PCR 解析の結果から推測されるそれと一致していた。

以上の実験により、得られた G418 耐性株 1-4、1-5、3-1、3-2 はヒト 14 番染色体の全てあるいはその部分断片を保持することが確かめられた。

(実施例 10) ヒト 14 番染色体断片を保持する ES 細胞からのキメラマウス作製

(実施例 9) で得られ、ヒト 14 番染色体を保持していることが確認された G418 耐性 ES 細胞株 4 株 (1-4、3-1、3-2、1-5) を凍結ストックより立ち上げ、ICR あるいは MCH (ICR) (日本クレア社) 雄雌マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に胚あたり 8 ~ 10 個注入した。ES 培地 (実施例 9) で一晚培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 ICR マウス (日本クレア社) の子宮に片側の子宮あたり約 10 個のインジェクション胚を移植した。その結果を (表 3) に示す。

表 3. ヒト14番染色体（断片）を保持するTT2 細胞株からのキメラマウス作製

ES細胞株/ ヒト染色体	G418耐性 株番号	ES細胞を注入し た8細胞期胚数	子マウス の数	キメラマウス の数	毛色への貢献率		
					～20%	20-50%	50-80%
TT2/#14	1-4	98	20	1	-	-	1
	1-5	110	14	2	1	-	1
	3-1	103	11	2	1	1	-
	3-2	183	19	3	-	2	1

計494個の注入胚を移植した結果、64匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚（ICR）由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかにより判定される。誕生した64匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は8匹であった。また、最高の貢献率は1-4由来の1個体における約80%であった。

この結果より、ヒト14番染色体またはその断片を保持するG418耐性ES細胞株（1-4、1-5、3-1、3-2）はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

（実施例11）ヒト14番染色体断片を保持するES細胞由来キメラマウスにおけるヒト14番染色体断片の保持確認

（実施例10）で得られたキメラマウスにおけるヒト14番染色体部分断片の保持は以下の（1）～（3）により確認した。

（1）各種組織由来DNAを用いたPCR解析

キメラマウスのうち3-1由来の1個体（K3-1-1：キメラ率約25%）について（実施例4）と同様に尻尾よりゲノムDNAを調製した。それを鋳型とし、（実施例9）で示した14番染色体解析用プライマーのうち3-1で検出された14種全てについてPCR解析を行なった。その結果、14種すべてについて期待される増幅産物

が検出された（図10）。

さらに、同じ個体（K3-1-1）について脳、腎臓、脾臓、心臓、肝臓、胸腺から Puregene DNA Isolation KitによりゲノムDNAを取得し、それぞれの組織について、IGMプライマー（実施例9）を用いたPCR解析を行なった。その結果全ての組織において期待される増幅産物が確認された（図11）。PCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動した後、臭化エチジウム染色して検出した。図11において、各レーンは左からB：脳、K：腎臓、Sp：脾臓、H：心臓、L：肝臓、Th：胸腺、pc：ヒト繊維芽細胞（HFL-1）DNA（陽性コントロール）、nc：非キメラマウス尻尾DNA（陰性コントロール）、M：マーカー（HindIII消化λ DNA+HaeIII消化φX174DNA、宝酒造）を示す。

## （2）尻尾由来繊維芽細胞のG418耐性試験

キメラマウスのうち、3-2由来の2個体（K3-2-1：キメラ率約25%、K3-2-3：キメラ率約50%）、1-4由来の1個体（K1-4-1：キメラ率約80%）について尻尾から以下のように繊維芽細胞を調製した。DNA調製（実施例4）と同様に3～6週令のキメラマウスの尻尾を5mm～10mm切断し、PBS/1mM EDTAで数回洗浄した後、メスで切れ込みをいれて表皮を除去し、内部の組織をメスで細かく切り刻む。組織細片を5mlのPBS/1mM EDTAをいれたチューブに移し、30分～1時間室温静置する。その後、1mlのPBS/EDTAを残して上清を取り除き、1mlの0.25%トリプシン/PBSを加え、5～10分間室温でタッピングあるいはピペッティングしながら組織をよくほぐす。1000rpm、10分間遠心し、沈殿を2mlのDMEM（10%FCS）に懸濁し、35mmシャーレに播種する。7～10日の培養後、トリプシン処理により細胞をシャーレからはがし、シャーレあたり約 $10^4$ 個の細胞を35mmシャーレ4枚に播種し、うち2枚に400μg/mlのG418を加え、5～7日間培養し、それぞれのシャーレの生細胞数をカウントする。この条件で、野生型ICRマウス由来の繊維芽細胞は、G418存在下ではほぼ100%死滅する。非選択培地での生細胞数に対する選択培地での生細胞数の割合は、G418耐性繊維芽細胞の増殖速度が2つの条件で同等であると仮定すれば、G418耐性ES細胞株由来繊維芽細胞の繊維芽細胞集団における貢献率を反映していると考えられる。この結果、（図12）に示した通り、3個体共G418耐性の繊維芽細胞の存在が認められた。図12において、耐性率はそれぞれの個体

WO 00/10385  
について2組の選択／非選択35mmシャーレから得られた値を平均した。ICRは野生型ICRマウスを示す。

### (3) 尻尾由来G418耐性繊維芽細胞のFISH解析

(実施例2)と同様な方法で、上記(2)で得られたG418耐性繊維芽細胞(K3-2-3, K1-4-1由来)のFISH解析を行なった。プローブはHFL-1細胞(実施例1)より抽出したヒト全DNAをFITC標識した(松原ら, FISH実験プロトコール, 秀潤社, 1994)ものを用いた。その結果、2個体共、ほとんどの分裂像に独立したヒト染色部分断片が観察された。

これらの結果より、ヒト14番染色体部分断片を保持したTT2細胞株はマウス個体において種々の正常組織に貢献し、かつヒト14番染色体部分断片を保持していることが確かめられた。

### (実施例12) ヒト2番染色体部分断片のES細胞への導入

染色体供与細胞として、(実施例1)で得られたヒト2番染色体部分断片を保持するマウスA9細胞W23(以下A9/#2 W23、という)を用いた。染色体受容細胞としてはマウスES細胞株TT2(実施例9)を用いた。マイクロセル融合実験およびG418耐性株の選択は(実施例2)と同様に行なった。薬剤耐性株の出現頻度はTT2細胞 $10^7$ 個あたり1~3個であった。薬剤耐性株の凍結保存、ゲノムDNA取得は(実施例2)と同様に行なった。薬剤耐性株5-1、5-2、5-3におけるヒト2番染色体部分断片の保持は以下の(1)、(2)により確認した。

#### (1) PCR解析

薬剤耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト2番染色体上に存在する遺伝子(Genetic Maps, 前記)のうち、染色体供与細胞A9/#2 W23において検出されたCκ、FABP1の存在をPCR法により検出した。

各プライマーについてPCR増幅を行なった結果、3株共に、両方のプライマーについて期待される増幅産物が確認された。

#### (2) フルオレッセンスin situハイブリダイゼーション(FISH)

FISH解析は(実施例2)と同様な方法で、ヒト2番染色体特異的プローブ(CHROMOSOME PAINTING SYSTEM, Cambio社)を用いて行なった。その結果、3株すべ



てのほとんどの分裂像において、ヒト2番染色体部分断片が独立した染色体として検出された。その大きさはA9/≠2 W23で観察されたものと同等であった。

以上の実験により、得られたG418耐性株はヒト2番染色体部分断片を保持することが確かめられた。

(実施例13) ヒト2番染色体断片を保持するES細胞からのキメラマウス作製

(実施例12) で得られ、ヒト2番染色体部分断片を保持していることが確認されたG418耐性ES細胞株5-1を凍結ストックより立ち上げ、ICRあるいはMCH(ICR)

(日本クレア社) 雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10～12個注入した。ES培地(実施例9)で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス(日本クレア社)の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。

キメラ作製の結果を(表4)に示す。

表4. ヒト2番染色体(断片)を保持するTT2細胞株からのキメラマウス作製

ES細胞株/ ヒト染色体	G418耐性 株番号	ES細胞を注入し た8細胞期胚数	子マウス の数	キメラマウス の数	毛色への貢献率		
					～20%	20-50%	50-80%
TT2/#2 (W23)	<u>5-1</u>	264	51	18	7	5	6

計264個の注入胚を移植した結果、51匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚(ICR)由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色(濃茶)が認められるかどうかにより判定される。誕生した51匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は18匹であった。また、最高の貢献率は約80%であった。

この結果より、ヒト2番染色体部分断片を保持するG418耐性ES細胞(5-1)は

キメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

(実施例14) ヒト14番染色体断片導入キメラマウス血清におけるヒト抗体重鎖の検出

血清中のヒト抗体濃度をエンザイムリンクドイムノソルベントアッセイ(ELISA)を用いて測定した。ELISAは以下に記載されている方法に従った。富山・安東、単クローン抗体実験マニュアル、講談社、1987; 安東・千葉、単クローン抗体実験操作入門、講談社、1991; 石川、超高感度酵素免疫測定法、学会出版センター、1993; Ed Harlow and David Lane, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; A. Doyle and J.B. Griffiths, Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures, John Wiley & Sons Ltd., 1996。これらの文献に記載の方法を参考にして、測定系によっては反応時間や温度を4℃で終夜行うなどの改良を行った。測定しようとするヒト免疫グロブリンに対する抗体あるいは抗原を、0.5 から10  $\mu$ g/ml程度に(100から5000倍)に希釈し、ELISAプレートを4℃で一晩コーティングした。血清試料の測定では、ブロッキング、試料および標識抗体の希釈に5%マウス血清(シグマ、M5905)を添加したPBSを、ハイブリドーマ培養上清の測定には1%牛胎児血清を添加したPBSを用いた。20倍にキメラマウス血清を希釈する場合にはPBSを用いて希釈した。コーティングしたプレートを洗浄した後、ブロッキングを1時間以上行った。プレートを洗浄後、試料を加え30分以上インキュベートした。プレート洗浄後100 から5000倍に希釈した酵素標識抗ヒト免疫グロブリン抗体を加えて、1時間以上インキュベートした後、プレートを洗浄し基質液を加えて発色させた。また測定系によって、基本的には同じ操作で、ビオチン標識した抗体を用い、プレート洗浄後これにアビジン-酵素複合体を加えてインキュベートした後洗浄し基質液を加えた。マイクロプレートリーダー(バイオテック、EL312e)で吸光度を測定した。

生後29日から35日のキメラマウス(実施例10、K3-1-2, K3-2-2, K3-2-3)より採血しELISAで解析した。50mMの炭酸-炭酸水素バッファーpH9.6で希釈した抗ヒトIgMマウスモノクローナル抗体(シグマ, 16385)を96穴マイクロタイターブ

レートにコーティングし、マウス血清（シグマ、M5905）を加えたPBSで希釈した血清試料を加えた。次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgMヤギ抗体（Tago, 2392）を加えてインキュベートした後、ABTS基質（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., 506200）の添加により酵素活性を405nmの吸光度で評価した。精製されたヒトIgM抗体（オルガノン・テクニカ、6001-1590）またはヒトIgG抗体（シグマ、I4506）を標準とした。標準はマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。またヒトIgG測定には抗ヒトIgGヤギ抗体（シグマ、I3382）をプレートに固定し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGヤギ抗体（シグマ、A0170）で検出した。その結果を（表5）に示す。ヒトIgMとIgGは共に検出された。

また生後27日、34日、41日の3回にわたりヒト14番染色体断片を保持したキメラマウス（実施例10、K3-1-1、K3-2-1）に、PBSに溶解したヒト血清アルブミン（HSA、シグマ、A3782）2mlをアジュバント（MPL+TDM Emulsion, RIBI Immunochem Research Inc.）と混合しその0.25mg/mlを0.2 mlを免疫した。このキメラマウス血清も同様にELISAによって解析した。その結果を（図13、図14）に示す。結果は、HSAで免疫したキメラマウス血清中のヒト抗体濃度は免疫後上昇し、個体K3-1-1ではヒトIgM18  $\mu$ g/mlとIgG2.6  $\mu$ g/mlが免疫後17日目の血清中に検出された。ヒト染色体を導入していないマウスの血清ではヒト抗体の力価は有意ではなかった。

表5. キメラマウス血清中のヒト抗体濃度(ELISA)

キメラマウス	IgG (mg/l)	IgM (mg/l)
K3-1-2	0.37	3.7
K3-2-2	0.33	5.9
K3-2-3	0.51	3.4

（実施例15）ヒト14番染色体導入キメラマウスからのヒト抗体重鎖産生ハイブ

## リドーマ取得

(実施例14) においてヒトアルブミンで免疫したキメラマウス(K3-1-1, 実施例14) から生後44日目に脾臓を取り出し、ミエローマ細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの作製法は〈安東、単クローン抗体実験操作入門、講談社サイエンティフィク, 1991〉に記された方法に従い、ミエローマ細胞としては、P3X63-Ag. 8.653 (大日本製薬より購入、05-565) を使用した。96穴プレート10枚にまき込み、1週間培養後培養上清をELISA法で解析した。ELISA法は抗ヒトIgMマウスモノクローナル抗体(シグマ、16385)をプレートに固定化して実施例14と同様に行ない、陽性のクローンを6個得た。またHSAを抗原とし50mMの炭酸-炭酸水素バッファーpH9.6で濃度5  $\mu$ g/mlの溶液とし、ELISAプレートの全ウェルに100  $\mu$ lずつ分注した。ペルオキシダーゼで標識した抗ヒトIgA+IgG+IgMヤギ抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., 04-10-17)を用いて検出した。プレート10枚中陽性のクローンを1つ確認した。このクローンは6個のヒトIgM陽性クローンのうちの1つであった。このクローン(H4B7)をさらに培養し、培養上清を希釈しHSAを抗原として上述のようにペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgMヤギ抗体(Tago, 2392)を用いてELISAを行なったところ、培養上清の希釈率の増加にともなって吸光度の減少が認められた。一方ヒトIgM(オルガノン・テクニカ, 6001-1590)を培地によって2  $\mu$ g/mlに希釈した試料では希釈率によらず吸光度は低かった。これはハイブリドーマH4B7が生産する抗体がHSAに特異性のある抗体であることを示唆するものである(図15)。図15において、横軸は培養上清試料の希釈率を縦軸は405nmにおける吸光度を示した。

(実施例16) G418耐性マーキングされたヒト2番染色体断片のピューロマイシン耐性による再マーキング

G418耐性で標識されたヒト2番染色体断片を保持するA9細胞(W23)(実施例1、図1参照)を100mmシャーレでG418(800  $\mu$ g/ml)を含む選択培地(10%FBS、DMEM)で培養した。ピューロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpPGKPuro(WHITEHEAD INSTITUTE, Dr. Peter W. Laird から分与)をトランスフェクション前に制限酵素Sall(宝酒造)で線状化した。細胞をトリプシン処理し、 $5 \times 10^6$  個

／mlとなるようにダルベッコのリン酸バッファー（PBS）に懸濁してから10 $\mu$ g DNA存在下でジーンパルサー（バイオラッド）を用いてエレクトロポレーション（実施例1参照）を行なった。25 $\mu$ Fの容量で1000Vの電圧を4mm長のエレクトロポレーションセル（実施例1）を用いて室温で印加した。エレクトロポレーションした細胞を100mmシャーレ3～6枚に播種した。1日後に10 $\mu$ g/mlのピューロマイシン（シグマ、P-7255）およびG418（800 $\mu$ g/ml）を含む二重選択培地と置き換えた。2～3週間後に生じたコロニー200個程度を一つの集団としてまとめた。この細胞を3つの集団についてそれぞれ25cm<sup>2</sup>フラスコ2～3本中で培養し、マイクロセルを形成させ25cm<sup>2</sup>フラスコで培養したマウスA9細胞と実施例1と同様に融合した。100mmシャーレ2枚に移しG418とピューロマイシンを含む上記の二重選択培地で培養し、3つの集団のうち1つの集団から2つの二重薬剤耐性クローンが得られた。このクローンではヒト2番染色体断片にピューロマイシン耐性マーカーが導入された可能性が高い。

（実施例17）ヒト染色体導入ES細胞における導入ヒト染色体倍加

G418耐性遺伝子でマーキングされたヒト14番染色体断片を保持するES細胞株（E14/#14-36）を、高濃度のG418を添加した培地中で培養することにより、ヒト染色体が倍化したES細胞のクローンを取得した（バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995）。G418耐性マウス初代細胞（ライフテックオリエンタルより購入）をマイトマイシン処理することなく100mmシャーレに播種し栄養細胞とした。この100mmシャーレにE14/#14-36を播種し、半日後G418濃度16mg/mlの培地と交換した。1～2日毎に培地交換し1週間後にG418濃度を10mg/mlとして培養を続け、生じたコロニーの中から15個を取り出し培養し、染色体をヒト14番特異的プローブ（実施例9参照）を用いてFISH解析した。結果として8クローンでヒト14番染色体断片が倍化していた。

（実施例18）ヒト2番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を同時に保持するマウスES細胞株の取得

（実施例16）において取得した二重薬剤耐性クローンのうちPG1をマイクロセル

供与細胞、野性型A9細胞を受容細胞としたマイクロセル移入実験により、PG1が保持するヒト2番染色体部分断片がさらにピューロマイシン耐性遺伝子によりマーキングされていることを確認した。マイクロセル取得及びA9細胞との融合は（実施例1）と同様に行なった。その結果、マイクロセル融合10日後に計59個のG418耐性コロニーが出現した。これらのコロニーについて8  $\mu$ g/mlのピューロマイシンを含む培地に交換後、さらに3日間培養したところ、45個（76%）のコロニーが生存した。マイクロセル法においては、1つの受容細胞に、多くの場合1本あるいは少数の染色体のみが移入されることから、両耐性遺伝子が高率に同時に移入されることは、すなわち、PG1が保持するG418耐性標識されたヒト2番染色体部分断片がピューロマイシン耐性遺伝子によりマーキングされていることを示している。さらに、ヒト2番染色体部分断片上の各マーカー遺伝子検出のため、A9/#2 W23（G418耐性のみ：実施例16）についてはpSTneoB（実施例1）、PG1についてはpPGKPuro（実施例16）をプローブとしたFISH解析を行なった（松原ら、FISH実験プロトコール、秀潤社、1994）。その結果、A9/#2 W23では（実施例12）で確認されたヒト2番染色体部分断片のそれぞれの姉妹染色分体上に1個ずつ、計2個のシグナルが観察された。これは、ヒト2番染色体部分断片上の1箇所にpSTneoBが挿入されていることを示す。また、PG1では同等の大きさの染色体断片上に計4個のシグナルが観察された。pSTneoBとpPGKPuroはベクター部分で相同の配列を持つので、pPGKPuroプローブではpSTneoBも検出される。すなわち、PG1で観察された4個のシグナルのうち、2個はpSTneoB、一方の2個はpPGKPuro由来のシグナルと考えられる。この結果より、PG1が保持するヒト2番染色体部分断片は、G418耐性、ピューロマイシン耐性両者によりマーキングされていることが確認された。

ヒト2番染色体部分断片、14番染色体部分断片を同時に保持するマウスES細胞取得のため、染色体供与細胞としてこのPG1細胞株を用いた。染色体受容細胞としてはすでにヒト14番染色体部分断片を保持しているG418耐性TT2細胞株1-4（実施例9）を用いた。マイクロセル融合実験およびピューロマイシン耐性株の選択は0.75  $\mu$ g/mlのピューロマイシン濃度で他は（実施例9）のG418耐性株選択の場合と同様に行なった。この結果出現したピューロマイシン耐性株の出現頻度は

1-4細胞 $10^7$ 個あたり3～7個であった。これらのピューロマイシン耐性株は300 $\mu$ g/mlのG418存在下でも増殖することからG418耐性も同時に保持していることが確認された。二重薬剤耐性株の凍結保存、ゲノムDNA取得は（実施例2）と同様に行なった。ヒト2番染色体部分断片及び、ヒト14番染色体部分断片の保持は二重薬剤耐性株PG5、PG15、PG16については以下の（1）により、PG15についてはさらに（2）により確認した。

#### （1）PCR解析

二重薬剤耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト2番、14番染色体上に存在する遺伝子（Genetic Maps, 前記）のうち、2番染色体については（実施例12；A9/#2 W23）、14番染色体については（実施例9；TT2/#14 1-4）で存在が確認されている各プライマーについてPCR増幅を行なった結果、3株共に、全てのプライマーについて期待される増幅産物が確認された。

#### （2）フルオレッセンスin situハイブリダイゼーション（FISH）

FISH解析は（実施例11）と同様に、ヒト全DNAをFITC標識したものをプローブとして用いて行なった。その結果、ほとんどの分裂像において、大小2つのヒト染色体断片が確認された。大きい方は（実施例9；TT2/#14 1-4）でヒト14番染色体特異的プローブにより確認された部分断片と、小さい方は（実施例12；TT2/#2 5-1）でヒト2番染色体特異的プローブにより確認された部分断片と同等の大きさであった。（図16）にその結果を示す。図中輝度の低い染色体はマウス由来のもの、FITCの蛍光により輝度の高い大小2つの染色体断片（矢印にて指示）はヒト由来のものであり、それぞれヒト14番、2番染色体部分断片と考えられる。

以上の実験により、得られた二重耐性ES細胞株はヒト2番染色体部分断片、14番染色体部分断片を同時に保持することが確かめられた。

（実施例19）ヒト2番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を同時に保持するマウスES細胞株からのキメラマウス作製

（実施例18）で得られ、ヒト2番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を保持していることが確認されたG418、ピューロマイシン二重耐性TT-2細胞株PG-5、PG15、PG16を凍結ストックより立ち上げ、ICRまたはMCH(ICR)（日本クレア社）

雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10～12個注入した。ES細胞用培地（実施例9）で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス（日本クレア社）の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。

キメラ作製の結果を（表6）に示す。

表6. ヒト2番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を同時に保持するマウスES細胞株からのキメラマウス作製

ES細胞株/ ヒト染色体	2重耐性 株番号	ES細胞を注入し た8細胞期胚数	子マウス の数	キメラマウス の数	毛色への貢献率		
					～10%	10-50%	50%～
TT2/	PG5	160	26	8	7	1	-
#14+#2	PG15	168	15	3	1	2	-
	PG16	223	32	12	3	6	3

計551個の注入胚を移植した結果、73匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚（ICR）由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかにより判定される。誕生した73匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は23匹であった。

この結果より、ヒト2番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を保持するES細胞株（PG5、PG15、PG16）はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

（実施例20）ヒト2番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を同時に保持するES細胞由来キメラマウス血清におけるヒト抗体の検出

（実施例19）で作製したキメラマウスのうち、KPG-15（9週齢；PG5由来、キメラ率10%）、KPG-18（5週齢；PG5由来、キメラ率10%）の2匹に対して、PB



Sに溶解したヒト血清アルブミン（HSA、シグマ、A3782）とアジュバント（MP L+TDM Emulsion、RIBI Immunochem Research Inc.）とを混合して0.25mg/mlのHSA溶液を調整し0.2mlを免疫した。免疫直前、及び8日後のキメラマウスより採血し、血清中のヒト抗体 $\mu$ 鎖およびヒト抗体 $\kappa$ 鎖をELISA法を用いて検出した（実施例14参照）。50mMの炭酸-炭酸水素バッファーpH9.6で希釈した抗ヒト抗体 $\kappa$ 鎖ヤギ抗体（VECTOR LABORATORIES, INC.、AI-3060）を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、血清試料を加え、次いでビオチン標識抗ヒト抗体 $\kappa$ 鎖ヤギ抗体（VECTOR LABORATORIES, INC.、BA-3060）を加えてインキュベートしさらにビオチン化ワサビペルオキシダーゼとアビジンDHの複合体（VECTOR LABORATORIES, INC.、Vectastain ABCキットPK4000）を加えてインキュベートした後、ペルオキシダーゼ基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン（TMBZ、住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価した。精製された $\kappa$ 鎖を持つ濃度既知のヒトIgG（シグマ、I-3889）を標準としマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。 $\mu$ 鎖については50mMの炭酸-炭酸水素バッファーpH9.6で希釈した抗ヒト $\mu$ 鎖マウスモノクローナル抗体（シグマ、I-6385）を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト $\mu$ 鎖マウス抗体（The Binding Site Limited、M P008）を加えてインキュベートした後、TMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価した。精製された $\mu$ 鎖を持つ濃度既知のヒトIgM（オルガノン・テクニカ、6001-1590）を標準としマウス血清（シグマ、M5905）を添加したPBSで段階的に希釈した。その結果、2個体とも免疫前においてヒト抗体 $\mu$ 鎖、 $\kappa$ 鎖両者が検出され、その血清中濃度は、免疫後上昇した（表7、表8）。

表 7. キメラマウス K P G 1 5 中のヒト抗体濃度 (E L I S A)

	I g M (m g / l)	I g $\kappa$ (m g / l)
免疫前	0. 1 9	1. 6
免疫後 8 日目	0. 7 5	1. 7

表 8. キメラマウス K P G 1 8 中のヒト抗体濃度 (E L I S A)

	I g M (m g / l)	I g $\kappa$ (m g / l)
免疫前	0. 2 9	0. 5 7
免疫後 8 日目	3. 4	0. 8 7

この結果より、ヒト2番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を保持するES細胞由来キメラマウスにおいてヒト抗体重鎖、軽鎖遺伝子は機能することが確認された。

(実施例21) ヒト14番染色体断片導入キメラマウス血清における抗HSAヒト抗体 $\gamma$ 鎖の検出

(実施例10)と同様にして作製したヒト14番染色体断片を保持したキメラマウス(K9、K11;共にTT2細胞株3-2由来、キメラ率はそれぞれ50%、30%)に対して、生後79日、93日、107日、133日の4回(K9)、または生後74日、88日、111日(K11)の3回にわたり(実施例20)と同様にHSAを免疫した。このキメラマウス血清中のヒト血清アルブミンに対するヒト $\gamma$ 鎖を含む抗体をELISA法によって検出した(実施例14参照)。50mMの炭酸-炭酸水素バッファーpH9.6で希釈したHSA(シグマ、A 3782)を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGマウス抗体(ファージンジェン、08007E)を加えてインキュベートした後、ペルオキシダーゼ基質として0-フェニレンジアミン(OPD、住友ベークライト、ML-11300)の添加により酵素活性を490nmの吸光度で評価した。HSAで免疫したキメラマウス血清中の抗HSAヒトIgGの力価は免疫後上昇した。対照ICRマウスでは、HSA免疫後の抗HSAヒトIgGの力価はバックグラウンドレベルであった。結果を(図17)に示した。図17において横軸はキメラマウスにHSAを免疫してからの日数を、縦軸は490nmにおける吸光度を示した。この結果より、ヒト14番染色体部分断片を保持するキメラマウスにおいて、HSA抗原刺激に対して抗原特異的ヒトIgGの抗体価上昇が起こることが確認された。

(実施例22) ヒト22番染色体断片導入キメラマウス血清におけるヒト抗体 $\lambda$ 鎖の検出

9ヶ月齢のキメラマウス(実施例3、K22-7;キメラ率10%)より採血し、血清中のヒト抗体 $\lambda$ 鎖をELISA法を用いて検出した(実施例14参照)。50mMの炭酸-炭酸水素バッファーpH9.6で希釈した抗ヒト抗体 $\lambda$ 鎖ヤギ抗体(VECTOR LABOR

ATORIES, INC., AI-3070) を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、血清試料を加え、次いでビオチン標識抗ヒト抗体λ鎖ヤギ抗体 (VECTOR LABORATORIES, INC., BA-3070) を加えてインキュベートしさらにビオチン化ワサビペルオキシダーゼとアビジンDHとの複合体 (VECTOR LABORATORIES, INC., Vectastain ABCキットPK4000) を加えてインキュベートした後、ペルオキシダーゼ基質としてTMBZ (住友ベークライト、ML-1120T) の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価した。精製されたλ鎖を持つ濃度既知のヒトIgG (シグマ、I-4014) を標準としマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。180ng/mlのヒトIgGに相当する濃度のヒト抗体λ鎖がキメラマウス中に検出された。この結果より、ヒト22番染色体を保持するキメラマウスにおいてヒト抗体λ鎖遺伝子が機能することが確認された。

#### (実施例23) ヒト2番染色体断片導入キメラマウス血清におけるヒト抗体κ鎖の検出

5週齢のキメラマウス (実施例13、K2-8、キメラ率は70%) および9週齢のキメラマウス (実施例13、K2-3、K2-4、K2-12、キメラ率はそれぞれ50%、20%、80%) より採血し、血清中のヒト抗体κ鎖をELISA法を用いて検出した (実施例14)。50mMの炭酸-炭酸水素バッファーpH9.6で希釈した抗ヒト抗体κ鎖ヤギ抗体 (VECTOR LABORATORIES, INC., AI-3060) を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、血清試料を加え、次いでビオチン標識抗ヒト抗体κ鎖ヤギ抗体 (VECTOR LABORATORIES, INC., BA-3060) を加えてインキュベートしさらにビオチン化ワサビペルオキシダーゼとアビジンDHの複合体 (VECTOR LABORATORIES, INC., Vectastain ABCキット) を加えてインキュベートした後、TMBZ (住友ベークライト、ML-1120T) の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価した。精製されたκ鎖を持つ濃度既知のヒトIgG (シグマ、I-3889) を標準としマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。結果を (表9) に示した。

表 9. キメラマウス中のヒト抗体  $\kappa$  鎖濃度 (E L I S A)

キメラマウス	lg $\kappa$ (mg / l)
K 2 - 3	1 2 4
K 2 - 4	8 5
K 2 - 8	2 5
K 2 - 1 2	5 6

またヒト 2 番染色体断片を保持したキメラマウス（実施例 13、K2-3、および K2-4）に生後 66 日、80 日、102 日の 3 回にわたり（実施例 20）と同様に HSA を免疫した。またキメラマウス（K2-12）に生後 63 日、77 日、91 日、116 日の 4 回にわたり、このキメラマウス血清中の HSA に対するヒト抗体  $\kappa$  鎖を ELISA 法によって検出した（実施例 14 参照）。50mM の炭酸-炭酸水素バッファー pH9.6 で希釈した HSA（シグマ、A 3782）を 96 穴マイクロタイタープレートにコーティングし、試料を加え、次いでビオチン標識抗ヒト抗体  $\kappa$  鎖ヤギ抗体（VECTOR LABORATORIES, INC.、BA-3060）を加えてインキュベートしさらにビオチン化ワサビペルオキシダーゼとアビジン DH の複合体（VECTOR LABORATORIES, INC.、Vectastain ABC キット）を加えてインキュベートした後、ペルオキシダーゼ基質として OPD（住友ベークライト、ML-11300）の添加により酵素活性を 490nm の吸光度で評価した。HSA で免疫したキメラマウス血清中の抗 HSA ヒト  $\kappa$  鎖の力価は免疫後上昇した。一方対照 ICR マウスでは、HSA 免疫後の抗 HSA ヒト抗体  $\kappa$  鎖の力価はバックグラウンドレベルであった。結果を（図 18）に示した。図 18 において横軸はキメラマウスに HSA を初めて免疫してからの日数を、縦軸は 490nm における吸光度を示した。これらの結果より、ヒト 2 番染色体部分断片を保持するキメラマウスにおいてヒト抗体  $\kappa$  鎖遺伝子が機能し、さらには HSA 抗原刺激に対して抗原特異的ヒト lg  $\kappa$  の抗体価上昇が起こることが確認された。

（実施例 24）ヒト 14 番染色体導入キメラマウスからのヒト抗体重鎖（ $\mu$  鎖もしくは

は $\gamma$ 鎖) 産生ハイブリドーマ取得

(実施例21) においてHSAで免疫したキメラマウスK9から生後136日目に脾臓を取り出し、ミエローマ細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの作製法は〈安東・千葉、単クローン抗体実験操作入門、講談社サイエンスティフィク、1991〉に記された方法に従い、ミエローマ細胞としては、Sp-2/0-Ag14 (大日本製薬、05-554) を使用した。培養液にORIGEN Hybridoma Cloning Factor (HCF、ボクスイ・ブラウン) を10%添加し96穴プレート8枚にまき込み、3日後に培養液中にG418を1mg/ml添加した。1～3週間培養後の培養上清をELISA法で解析した(実施例14参照)。 $\mu$ 鎖は50mMの炭酸-炭酸水素バッファーpH9.6で希釈した抗ヒト $\mu$ 鎖マウスモノクローナル抗体(シグマ、I-6385)を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、PBSで希釈した試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト $\mu$ 鎖マウス抗体(The Binding Site Limited、MP008)を加えてインキュベートした後、基質として2,2'-アジノジー(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩(ABTS、Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.、04-10-17)を用いて検出し7個の陽性ウェルを得た。 $\gamma$ 鎖については抗ヒト $\gamma$ 鎖マウスモノクローナル抗体(シグマ、I-6260)を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、PBSで希釈した試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト $\gamma$ 鎖マウス抗体(ファーマンジェン、08007E)を加えてインキュベートした後、ABTS(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.、04-10-17)を用いて検出し2個のヒト抗体 $\gamma$ 鎖陽性ウェルを得た。

(実施例25) ヒト2番染色体導入キメラマウスからのヒト抗体 $\mu$ 鎖産生ハイブリドーマ取得

(実施例23) においてHSAで免疫したキメラマウスK2-3から生後105日目に脾臓を取り出し、ミエローマ細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの作製法は〈安東・千葉、単クローン抗体実験操作入門、講談社サイエンスティフィク、1991〉に記された方法に従い、ミエローマ細胞としては、P3X63Ag8.653 (大日本製薬、05-565) を使用した。培養液にHCF (ボクスイ・ブラウン) を10%添加し96穴プレート10枚にまき込み、3日後培養液中にG418を1mg/ml

添加し、1～3週間培養しコロニーが出現したウェルの培養上清をELISA法で解析した。ELISA法は（実施例23）と同様に行ない、ヒト抗体 $\kappa$ 鎖陽性のクローンを2個得た。

（実施例26）G418耐性マーキングされたヒト22番染色体のピューロマイシン耐性による再マーキング

G418耐性で標識されたヒト22番染色体を保持するA9細胞（A9/#22 $\gamma$ 2；実施例1で取得）について、（実施例16）と同様な方法でヒト22番染色体のピューロマイシン耐性による再マーキングを行った。 $\gamma$ 2細胞にpPGKPuroをエレクトロポレーションして得られた二重薬剤耐性株コロニー200個程度を一つの集団とし、3つの集団（P1、P2、P3）を供与細胞として野生型マウスA9細胞へのマイクロセル移入を行なった。その結果、P1より6個、P2より1個、P3より3個の二重薬剤耐性クローンが得られた。取得した二重薬剤耐性クローンのうちP3由来の6-1をマイクロセル供与細胞、野生型A9細胞を受容細胞としたマイクロセル移入実験により、ヒト22番染色体がさらにピューロマイシン耐性遺伝子によりマーキングされていることを確認した（実施例18）。マイクロセル取得及びA9細胞との融合は（実施例1）と同様に行なった。その結果、マイクロセル移入11日後に28個のG418耐性コロニーが出現した。これらのコロニーについて8 $\mu$ g/mlのピューロマイシンを含む培地に交換した後、さらに3日間培養したところ、21個（75%）のコロニーが生存した。マイクロセル法においては、1つの供与細胞に、多くの場合1本あるいは少数の染色体のみが移入されることから、両耐性遺伝子が高率に同時に移入されることは、すなわち、6-1が保持するG418耐性標識されたヒト22番染色体がさらにピューロマイシン耐性遺伝子によりマーキングされていることを示している。

（実施例27）ヒト抗体重鎖を産生するハイブリドーマからのヒト抗体重鎖可変領域cDNAの取得及び塩基配列決定

（実施例15）において取得されたヒト抗体重鎖（IgM）を産生するハイブリドーマのうち、H4B7（HSA特異的）及びH8F9（非特異的）より、ISOGEN（ニッポンジーン）を使用して、総RNAを取得した。cDNAの合成は、Ready-To-Go T-primed

1st strandキット (Pharmacia社) を用い各々 5  $\mu$ g の総RNAを使用した。得られたcDNAについて下記に示したプライマー (Larrickら, BIO/TECHNOLOGY, 7, 934-, 1989、Wordら, Int. Immunol., 1, 296-, 1989を参考に作製) によりPCRを行ない、ヒト抗体重鎖可変領域を増幅した。

CM1 (ヒトIgM定常領域) : 5'-TTGTATTTCCAGGAGAAAGTG (配列番号45)

CM2 (同上) : 5'-GGAGACGAGGGGGGAAAAGGG (配列番号46)

HS1 (ヒト重鎖可変領域) : 5'-ATGGACTGGACCTGGAGG(AG)TC(CT)TCT(GT)C (配列番号47) (8種の混合物)

HS2 (同上) : 5'-ATGGAG(CT)TTGGGCTGA(GC)CTGG(GC)TTT(CT)T (配列番号48) (16種の混合物)

HS3 (同上) : 5'-ATG(AG)A(AC)(AC)(AT)ACT(GT)TG(GT)(AT)(GCT)C(AT)(CT)(GC)CT(CT)CTG (配列番号49) (6144種の混合物)

\* ( ) はその位置の塩基が ( ) 内のいずれかからなる混合物であることを示す。

H4B7、H8F9共に、1回目のPCRはHS1  $\times$  CM1、HS2  $\times$  CM1、HS3  $\times$  CM1の3種のプライマーの組み合わせについて行い (94°C 1分、50°C 2分、72°C 3分、40サイクル、パーキンエルマー社、サーマルサイクラー140使用)、そのPCR産物をそれぞれHS1  $\times$  CM2、HS2  $\times$  CM2、HS3  $\times$  CM2のプライマーで再度増幅した (温度条件は前記同様、30サイクル)。増幅産物は1.5%アガロース電気泳動後、臭化エチジウム染色することにより検出した。その結果、H4B7についてはHS3  $\times$  CM2のプライマーで約490bpの増幅産物が確認された。また、H8F9については、HS3  $\times$  CM2プライマーで微かなバンドが同様の位置に確認されたのでこのプライマーで再度増幅した (温度条件は前記同様、30サイクル)。その結果、増幅産物は非常に強いシグナルとして検出された。これらのPCR産物は、石田ら (遺伝子発現実験マニュアル、講談社サイエンティフィク、1995) の方法に従い、pBlueScript II SK+ (Stratagene社) ベクターのSmaI部位にクローニングした。増幅産物の挿入されたプラスミドのうち#2、#3、#4 (H4B7)、#11、#13、#14 (H8F9) について、自動蛍光シーケンサー (Applied Bio System社) により、増幅産物の塩基配列を決定した。得られた塩基配列及び予想されるアミノ酸配列をすでに報告されているヒト抗体VH領域 (Marksら, Eur. J. Immunol. 21, 985-, 1991)、



JH領域（Ravetchら, Cell, 27, 583-, 1981）の配列と比較した結果、H4B7、H8F9共に、VH4ファミリー、JH2の組み合わせからなることが判明した。この結果は、ヒト14番染色体部分断片を保持するキメラマウスにおいて、完全な機能的ヒト抗体重鎖蛋白質が産生されていることを示している。

（実施例28）ヒト抗体κ鎖を発現するキメラマウス脾臓からのヒト抗体κ鎖cDNAの取得と塩基配列決定

（実施例13）において取得され、（実施例23）においてヒト抗体κ鎖を発現することが確認されたキメラマウスK2-8の脾臓より（実施例5）と同様な方法で合成したcDNAについて、下記のプライマー（Larrickら, BIO/TECHNOLOGY, 7, 934-, 1989、Whitehurstら, Nucleic Acids Res., 20, 4929-, 1992を参考に作製）によりPCRを行ない、ヒトκ鎖可変領域を増幅した。陰性コントロールとしてK2-8より取得した肝臓由来cDNA及び、（実施例10）のTT2/#14 3-2由来キメラマウスK3-2-2より取得した脾臓由来cDNAを用いた。

KC2（ヒトIgκ鎖定常領域）：5'-CAGAGGCAGTTCAGATTTC（配列番号50）

KC3（同上）：5'-TGGGATAGAAGTTATTCAGC（配列番号51）

KVMIX（ヒトIgκ鎖可変領域）：

5'-ATGGACATG(AG)(AG)(AG)(AGT)(CT)CC(ACT)(ACG)G(CT)(GT)CA(CG)CT  
T（配列番号52）（3456種の混合物）

\*（ ）はその位置の塩基が（ ）内のいずれかからなる混合物であることを示す。

PCRはKVMIX×KC2、KVMIX×KC3プライマーの組み合わせで94℃15秒、55℃15秒、72℃20秒、40サイクル（パーキンエルマー社、サーマルサイクラー9600使用）の条件で行なった。増幅産物は1.5%アガロース電気泳動後、臭化エチジウム染色することにより検出した。その結果、両者の組み合わせ共に、期待される約420bps（KC2）、約450bps（KC3）の長さの増幅産物が検出された。一方、2種の陰性コントロールでは特異的増幅産物は検出されなかった。これらの増幅産物は、石田ら（遺伝子発現実験マニュアル、講談社サイエンティフィク、1995）の方法に従い、pBlueScriptII SK+（Stratagene社）ベクターのSmaIあるいはEcoRV部位にクローニングした。増幅産物の挿入されたプラスミドのうちKVMIX×KC

2由来のVK-#1クローン1種類について、自動蛍光シーケンサー（Applied Bio System社）により、増幅産物の塩基配列を決定した。得られた塩基配列はヒトIg $\kappa$ 鎖の開始コドンから定常領域に至るまで終始コドンを含まないで、クローニングされた増幅産物は機能的ヒトIg $\kappa$ 鎖可変領域をコードしていると考えられる。また、すでに報告されているヒト抗体V $\kappa$ 領域（Kleinら, Eur. J. Immunol., 23, 3248-, 1993）、J $\kappa$ 領域（Whitehurstら, 前記）の塩基配列と比較した結果、V $\kappa$ 3ファミリー、J $\kappa$ 4の組み合わせからなることが判明した。この結果は、ヒト2番染色体部分断片を保持するキメラマウスにおいて、完全な機能的ヒト抗体 $\kappa$ 鎖蛋白質が産生されていることを示している。

（実施例29）ヒト14番染色体断片を保持するキメラマウスの血清中のヒト抗体 $\gamma$ 鎖サブクラスおよび $\mu$ 鎖の検出、および定量

（実施例10）の生後11週齢のキメラマウス（K15AおよびK16A；1-4由来、キメラ率70、50%）より採血し、血清中のヒト抗体 $\gamma$ 鎖サブクラス濃度を（実施例14）に従いELISA法を用いて検出した。

〔ヒトIgG1の測定〕抗ヒトIgG抗体（シグマ、I-6260）をPBSで希釈し、96穴マイクロタイタープレートをコーティングした。血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識した抗ヒトIgG1抗体（ファーマンジェン、08027E）を加えてインキュベートした後、TMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価した。精製された濃度既知のヒトIgG1（シグマ、I-3889）を標準としマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。

〔ヒトIgG2の測定〕抗ヒトIgG2抗体（シグマ、I-9513）をPBSで希釈し、96穴マイクロタイタープレートをコーティングした。血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識した抗ヒトIgG抗体（シグマ、A-0170）を加えてインキュベートした後、TMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価した。精製された濃度既知のヒトIgG2（シグマ、I-4139）を標準としマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。

〔ヒトIgG3の測定〕抗ヒトIgG3抗体（シグマ、I-7260）を100mMグリシン塩酸バッファーpH2.5で希釈し5分間室温で放置した後、100mMリン酸バッファーpH

7.0で10倍に希釈し、96穴マイクロタイタープレートをコーティングした。血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識した抗ヒトIgG抗体（ファーマーミンジェン、08007E）を加えてインキュベートした後、TMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価した。精製された濃度既知のヒトIgG3（シグマ、I-4389）を標準としマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。

〔ヒトIgG4の測定〕抗ヒトIgG4抗体（シグマ、I-7635）を100mMグリシン塩酸バッファーpH2.5で希釈し5分間室温で放置した後、100mMリン酸バッファーpH7.0で10倍に希釈し、96穴マイクロタイタープレートをコーティングした。血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識した抗ヒトIgG抗体（ファーマーミンジェン、08007E）を加えてインキュベートした後、TMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価した。精製された濃度既知のヒトIgG4（シグマ、I-4639）を標準としマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。

〔ヒトIgMの測定〕 $\mu$ 鎖についてはPBSで希釈した抗ヒト $\mu$ 鎖マウスモノクローナル抗体（シグマ、I-6385）を96穴マイクロタイタープレートをコーティングし、血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト $\mu$ 鎖マウス抗体（The Binding Site Limited、MP008）を加えてインキュベートした後、ペルオキシダーゼ基質としてTMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価し、精製された $\mu$ 鎖を持つ濃度既知のヒトIgM（オルガノン・テクニカ、6001-1590）を標準としマウス血清（シグマ、M5905）を添加したPBSで段階的に希釈した。

結果を表10に示す。キメラマウスK15AとK16Aの2個体でIgG1, IgG2, IgG3, IgG4のすべてのサブクラスおよびIgMが検出された。

表10. キメラマウス中のヒト抗体IgGサブクラスおよびIgM濃度 (ELISA)

キメラマウス	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM (mg/l)
K15A	2.25	1.96	0.17	0.43	7.09
K16A	0.30	0.69	0.10	0.07	0.87

(実施例30) ヒト22番染色体を保持するマウスES細胞株(TT2)の取得  
 ヒト22番染色体を保持するマウスES細胞(TT2)取得のため、染色体供与細胞として(実施例26)で取得した6-1(A9/#22, G418, プューロマイシン耐性)細胞株を用いた。染色体受容細胞としては野生型TT2細胞株(実施例9)を用いた。ミクロセル融合実験およびプューロマイシン耐性株の選択は $0.75 \mu\text{g/ml}$ のプューロマイシン濃度で他は(実施例9)のG418耐性株選択の場合と同様に行なった。この結果出現したプューロマイシン耐性株の出現頻度はTT2細胞 $10^7$ 個あたり1~2個であった。プューロマイシン耐性株の凍結保存、ゲノムDNA取得は(実施例2)と同様に行なった。ヒト22番染色体の保持はプューロマイシン耐性株PG22-1について以下の(1)、(2)により確認した。

#### (1) PCR解析

プューロマイシン耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト22番染色体上に存在する遺伝子(Genetic Maps, 前記)のうち、(実施例2; A9/#22)で存在が確認されている10種のプライマーについてPCR増幅を行なった結果、(実施例2; A9/#22)に存在した全てのマーカーが検出された。

(2) サザンブロット解析(実施例2)で示した方法に従い、ヒトL1配列をプローブとして用い、陰性コントロール野生型TT2、染色体供与細胞6-1、プューロマイシン耐性TT2細胞株PG22-1由来のゲノムDNAについて行った。その結果を(図19)に示す。図中左側にDNA分子量を示した。PG22-1におけるバンドパターンは6-1のそれと一致し、シグナル強度も同程度であることから、6-1細胞株中の22番染色体は確かにPG22-1に移入されたことが確認された。

以上の実験によりピューロマイシン耐性TT2細胞株PG22-1はヒト22番染色体の全てあるいは大部分を保持することが確認された。

(実施例31) ヒト22番染色体を保持するマウスES細胞株(TT2)からのキメラマウス作製

(実施例30)で得られ、ヒト22番染色体を保持していることが確認されたピューロマイシン耐性TT2細胞株PG22-1を凍結ストックより立ち上げ、ICRまたはMCH(ICR)(日本クレア社)雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10~12個注入した。ES細胞用培地(実施例9)で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス(日本クレア社)の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。

キメラ作製の結果を(表11)に示す。計266個の注入胚を移植した結果、36匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚(ICR)由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色(濃茶)が認められるかどうかにより判定される。誕生した36匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は8匹であった。

この結果より、ヒト22番染色体を保持するES細胞株(TT2由来、PG22-1)はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

表11. ヒト22番染色体を保持するTT2細胞株からのキメラマウス作製

ES細胞株/ ヒト染色体	ピューロマイシン 耐性株番号	ES細胞を注入し た8細胞期胚数	子マウス の数	キメラ マウスの数	毛色への貢献率		
					~20%	20-50%	50-80%
TT2/#22	PG22-1	266	36	8	4	1	3

(実施例32) ヒト22番染色体を保持するキメラマウスの血清中のヒト抗体λ鎖の検出、および定量

(実施例31) のキメラマウスKPG22-1～3の血清中のヒト抗体濃度を(実施例14)に従いELISA法を用いて定量した。生後2ヶ月のキメラマウスより採血し、血清中のヒト抗体λ鎖をELISA法を用いて検出した。PBSで希釈した抗ヒト免疫グロブリンλ鎖抗体(VECTOR LABORATORIES, INC.、IA-3070)を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、血清試料を加え、次いでビオチン標識した抗ヒト免疫グロブリンλ鎖抗体(VECTOR LABORATORIES, INC.、BA-3070)を加えてインキュベートしさらにビオチン化ワサビペルオキシダーゼとアビジンDHの複合体(VECTOR LABORATORIES, INC.、Vectastain ABCキット)を加えてインキュベートした後、TMBZ(住友ベークライト、ML-1120T)の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価し、精製されたλ鎖を持つ濃度既知のヒトIgM(大日本製薬、U13200)を標準としマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。結果を表12に示す。この結果より22番染色体を保持するキメラマウスにおいてヒト抗体λ鎖遺伝子が機能することが確認された。

表12. キメラマウス中のヒト抗体λ鎖濃度(ELISA)

キメラマウス	キメラ率%	Ig λ (mg/l)
KPG22-1	50	12
KPG22-2	50	18
KPG22-3	20	24

(実施例33) ヒト22番染色体導入キメラマウス血清における抗ヒトHSAヒト体λ鎖の検出

キメラマウス(実施例31、KPG22-3)に生後79日、94日、110日の3回にわたり(実施例20)と同様にHSAを免疫した。血清中のヒト抗体λ鎖を(実施例14)

に従いELISA法を用いて検出した。50mMの炭酸-炭酸水素バッファーpH9.6で5  $\mu$ g/mlに希釈したHSA（シグマ、A 3782）を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、血清試料を加え、次いでビオチン標識した抗ヒト免疫グロブリン $\lambda$ 鎖抗体（VECTOR LABORATORIES, INC.、BA-3070）を加えてインキュベートしさらにビオチン化ワサビペルオキシダーゼとアビジンDHの複合体（VECTOR LABORATORIES, INC.、Vectastain ABCキット）を加えてインキュベートした後、TMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価した。HSAで免疫したキメラマウス血清中の抗HSAヒト $\lambda$ 鎖の力価は免疫後上昇した。一方対照としたICRマウスでは、HSA免疫後の抗HSAヒト抗体 $\lambda$ 鎖の力価はバックグラウンドレベルであった。結果を（図20）に示す。図20において横軸はキメラマウスに初めてHSAを免疫してからの日数を、縦軸は450nmにおける吸光度を示した。これらの結果より、ヒト22番染色体を保持するキメラマウスにおいてヒト抗体 $\lambda$ 鎖遺伝子が機能し、さらにはHSA抗原刺激に対して抗原特異的ヒトIg $\lambda$ の抗体価上昇が起こることが確認された。

（実施例34）ヒト22番染色体導入キメラマウスからのヒト抗体軽鎖産生ハイブリドーマ取得

（実施例25）と同様に（実施例33）においてヒトアルブミンで免疫したキメラマウスKPG22-3から生後113日目に脾臓を取り出し、ミエローマ細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの作製法は〈安東・千葉、単クローン抗体実験操作入門、講談社サイエンティフィク、1991〉に記された方法に従い、ミエローマ細胞としては、SP-2/0-Ag14（大日本製薬、05-554）を使用した。培養液にHCF（エア・ブラウン）を10%添加し96穴プレート5枚にまき込み、1～3週間培養しコロニーが出現したウェルの培養上清をELISA法で解析した。ELISA法は（実施例33）と同様に行ない、ヒト抗体 $\lambda$ 鎖陽性のクローンを4個得た。

（実施例35）ヒト22番染色体部分断片及び、14番染色体部分断片を同時に保持するマウスES細胞株の取得

ヒト22番染色体、14番染色体部分断片を同時に保持するマウスES細胞取得のため、染色体供与細胞として（実施例26）で取得した6-1（A9/#22, G418, プューロマイシン耐性）細胞株を用いた。染色体受容細胞としてはすでにヒト14番染色体部分断片を保持しているG418耐性TT2細胞株1-4（実施例9）を用いた。ミクロセル融合実験およびプューロマイシン耐性株の選択は0.75  $\mu$ g/mlのプューロマイシン濃度で他は（実施例9）のG418耐性株選択の場合と同様に行なった。この結果出現したプューロマイシン耐性株の出現頻度は1-4細胞 $10^7$ 個あたり1～2個であった。これらのプューロマイシン耐性株は300  $\mu$ g/mlのG418存在下でも増殖することからG418耐性も同時に保持していることが確認された。二重薬剤耐性株の凍結保存、ゲノムDNA取得は（実施例2）と同様に行なった。ヒト22番染色体及び、ヒト14番染色体部分断片の保持は二重薬剤耐性株PG22-5について以下のPCR解析により確認した。二重薬剤耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト22番、14番染色体上に存在する遺伝子（Genetic Maps, 前記）のうち、22番染色体については（実施例2；A9/#22）、14番染色体については（実施例9；TT2/#14 1-4）で存在が確認されている各プライマーについてPCR増幅を行なった結果、22番染色体については10種のうち3種のマーカー（D22S275, D22S315, Ig $\lambda$ ）、14番染色体についてはTT2/#14 1-4に存在した全てのマーカーが検出された。以上の実験により、得られた二重耐性TT2細胞株はヒト22番染色体部分断片、14番染色体部分断片を同時に保持することが確かめられた。

（実施例36）ヒト22番染色体部分断片及び、14番染色体部分断片を同時に保持するマウスES細胞株からのキメラマウス作製

（実施例35）で得られ、ヒト22番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を保持していることが確認されたG418、プューロマイシン二重耐性TT2細胞株PG22-5を凍結ストックより立ち上げ、ICRまたはMCH(ICR)（日本クレア社）雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10～12個注入した。ES細胞用培地

（実施例9）で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス（日本クレア社）の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。



キメラ作製の結果を（表13）に示す。計302個の注入胚を移植した結果、16匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚（ICR）由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかにより判定される。誕生した16匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は5匹であった。

この結果より、ヒト22番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を保持するES細胞株（PG22-5）はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

表13. ヒト22番染色体と14番染色体を保持するTT2細胞株からのキメラマウス作製

ES細胞株/ ヒト染色体	二重耐性 株番号	ES細胞を注入し た8細胞期胚数	子マウス の数	キメラ マウスの数	毛色への貢献率		
					～20%	20-50%	50-80%
TT2/#22+14	PG22-5	302	16	5	3	2	0

（実施例37）ヒト22番染色体部分断片及び、14番染色体部分断片を同時に保持するES細胞由来キメラマウス血清中のヒト抗体λ鎖およびヒト抗体μ鎖の検出・定量

（実施例36）のキメラマウス（KPG22-9、10、および12）に対して、HSAを免疫した。KPG22-9とKPG22-10には生後11週齢で免疫し、その2週間後に採血した。KPG22-12には生後7週齢と9週齢2度免疫し、2度目の免疫の2週間後に採血した。

血清中のヒト抗体μ鎖およびヒト抗体λ鎖さらにヒトλ鎖かつヒトμ鎖を有する抗体を（実施例14）に従いELISA法を用いて検出した。

完全ヒト抗体の検出にはPBSで希釈した抗ヒト免疫グロブリンλ鎖抗体（Kirk  
egaard & Perry Laboratories Inc.、01-10-11）を96穴マイクロタイタープレー

トにコーティングし、血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\mu$ 鎖抗体（The Binding Site Limited、MP008）を加えてインキュベートした後、ペルオキシダーゼ基質としてTMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価し、精製された $\lambda$ 鎖を持つ濃度既知のヒトIgM（大日本製薬、U13200）をマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈したものと比較し血清中のヒト抗体濃度を求めた。ヒト抗体 $\mu$ 鎖およびヒト抗体 $\lambda$ 鎖をELISA法を用いて（実施例29）および（実施例32）と同様に検出・定量した。結果を表14に示す。キメラマウスでは $\lambda$ 鎖と $\mu$ 鎖がともに検出された。ヒト抗体 $\mu$ 鎖かつ $\lambda$ 鎖を持つ抗体も検出された。この結果より、ヒト22番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を保持するES細胞由来キメラマウスにおいてヒト抗体 $\lambda$ 鎖遺伝子とヒト抗体 $\mu$ 鎖遺伝子は同時に機能し、一部のB細胞では重鎖と軽鎖がともにヒトである完全抗体が産生されることが確認された。

また対照として測定したヒト14番染色体のみを保持する（実施例10）のキメラマウス（K9）、ヒト22番染色体のみを保持する（実施例31）のキメラマウス（KPG22-2）の血清中のヒト抗体 $\lambda$ 鎖かつ $\mu$ 鎖を持つ抗体濃度はバックグラウンドレベルであり、ここでの検出系はヒト $\lambda$ 鎖かつ $\mu$ 鎖を持つ完全抗体のみを検出していることが確認された。

表14. キメラマウス中のヒト抗体濃度(ELISA)

ESクローン	キメラマウス	キメラ率%	IgM(mg/l)	Ig $\lambda$ (mg/l)	IgM, $\lambda$ (mg/l)
PG22-5	KPG22-9	30	2.54	9.9	0.043
PG22-5	KPG22-10	5	4.96	21.5	0.333
PG22-5	KPG22-12	40	3.71	7.0	0.048
3-2	K9	50	6.66	-	<0.003
PG22-1	KPG22-2	50	-	17.6	<0.003

(実施例38) ヒト。2 染色体部分断片及び、14番染色体部分断片を同時に保持するES細胞由来キメラマウス血清におけるヒト抗体の検出 (ヒト $\kappa$ 鎖かつヒト $\mu$ 鎖を有する抗体)

(実施例19) で作製したキメラマウスKPG-15 (TT2ES クローンPG 5 由来、キメラ率10%) に対して、生後2 から3 ヶ月齢の間に、PBSに溶解したヒト血清アルブミン (HSA、シグマ、A3782) とアジュバント (MPL+TDM Emulsion, RIBI Immunochem Reseach Inc.) とを混合して0.25mg/mlのHSA溶液を調整し0.2mlを3回免疫し、採血した。また生後6 週齢の (実施例19) のキメラマウスKPG-26 (TT2ES クローンPG 6 由来、キメラ率40%) から採血した。血清中の完全ヒト抗体濃度を (実施例14) に従いELISA法で検出した。PBSで希釈した抗ヒト免疫グロブリン $\kappa$ 鎖抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., 01-10-10) を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、マウス血清 (シグマ、M5905) を加えたPBSで希釈した血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\mu$ 鎖抗体 (The Binding Site Limited, MP008) を加えてインキュベートした後、ペルオキシダーゼ基質としてTMBZ (住友ベークライト、ML-1120T) の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価し、精製された $\kappa$ 鎖を持つ濃度既知のヒトIgM (オルガノン・テクニカ、6001-1590) を標準としマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈した。 $\kappa$ 鎖、 $\mu$ 鎖については (実施例20) と同様にして濃度を求めた。結果を表15に示す。ヒト抗体 $\mu$ 鎖かつ $\kappa$ 鎖を持つ抗体が検出された。また対照としたヒト14番染色体のみを保持する (実施例10) のキメラマウス (K9)、ヒト2 番染色体のみを保持する (実施例13) のキメラマウス (K2-9) 血清中のヒト抗体で $\kappa$ 鎖かつ $\mu$ 鎖を持つ抗体濃度は0.002mg/ml以下でバックグラウンドレベルであった。この結果より、ヒト2 番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を保持するES細胞由来キメラマウスにおいてヒト抗体 $\kappa$ 鎖遺伝子とヒト抗体 $\mu$ 鎖遺伝子は同時に機能し、一部のB細胞では重鎖と軽鎖がともにヒトである完全抗体が産生されることが確認された。

ESクローン	キメラマウス	キメラ率%	IgM(mg/l)	Ig $\kappa$ (mg/l)	IgM, $\kappa$ (mg/l)
PG-5	KPG15	10	0.18	1.01	0.075
PG-6	KPG26	40	1.52	1.26	0.018
3-2	K9	50	6.66	-	0.002以下
5-1	K2-9	40	-	135	0.002以下

(実施例39) ヒト2番染色体部分断片を保持するマウスES細胞株 (TT2F, X0)

#### の取得

ヒト2番染色体部分断片を保持するマウスES細胞 (X0) 取得のため、染色体供与細胞として (実施例16) で取得したPG1細胞株を用いた。染色体受容細胞としては (39, X0) の染色体構成を持ち、キメラマウスにおいて効率よく卵細胞に分化することが報告されている (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲットティング, 羊土社, 1995) TT2F細胞株 (ライフテックオリエンタル社より購入) を用いた。マイクロセル融合実験およびピューロマイシン耐性株の選択は0.75  $\mu$ g/mlのピューロマイシン濃度で他は (実施例9) のG418耐性株選択の場合と同様に行なった。この結果出現したピューロマイシン耐性株の出現頻度はTT2F細胞10<sup>7</sup>個あたり5個であった。これらのピューロマイシン耐性株の凍結保存、ゲノムDNA取得は (実施例2) と同様に行なった。ヒト2番染色体部分断片の保持は薬剤耐性株P-20, P-21について以下のPCR解析により確認した。薬剤耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト2番染色体上に存在する遺伝子 (Genetic Maps, 前記) のうち、(実施例1; A9/#2 w23) で存在が確認されているプライマーC $\kappa$ 、FA BP1、V $\kappa$ 1-2の3種についてPCR増幅を行なった結果、2株共に、3種全てのプライマーについて期待される増幅産物が確認された。

以上の実験により、得られたピューロマイシン耐性ES細胞株 (TT2F, X0) はヒト2番染色体部分断片を保持することが確かめられた。

(実施例40) ヒト2番染色体部分断片を保持するマウスES細胞株(TT2F, X0)からのキメラマウス作製

(実施例39)で得られ、ヒト2番染色体部分断片を保持していることが確認されたピューロマイシン耐性TT2F細胞株P-21を凍結ストックより立ち上げ、ICRまたはMCH(ICR)(日本クレア社)雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10~12個注入した。ES細胞用培地(実施例9)で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス(日本クレア社)の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。

計141個の注入胚を移植した結果、20匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚(ICR)由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色(濃茶)が認められるかどうかにより判定される。キメラ作製の結果を(表16)に示す。誕生した20匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は9匹であった。うち4個体は毛色が完全に野生色の(ES細胞に由来する)キメラマウスであった。

この結果より、ヒト2番染色体部分断片を保持するES細胞株(P-21)はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

表16. ヒト2番染色体部分断片を保持するTT2F細胞株からのキメラマウス作製

ES細胞株/ ヒト染色体	ピューロマイシン 耐性株 番号	ES細胞を注入 した8細胞期 胚数	子マウス の数	キメラ マウスの数	毛色への貢献率			
					~20%	20-50%	50-90%	100%
TT2F/#2fg.	P-21	141	20	9	0	2	3	4

(実施例41) ヒト23染色体部分断片を保持するTT2F由来キメラマウスの血清中のヒト抗体κ鎖の検出、および定量

(実施例40)の生後約1ヶ月齢のキメラマウス(P-21由来、キメラ率100%、K2-1F~4F)より採血し血清中のヒト抗体 $\kappa$ 鎖濃度を(実施例20)と同様にELISA法を用いて定量した。

結果を表17に示す。使用するES細胞をTT2Fとしてもヒト抗体 $\kappa$ 鎖遺伝子がキメラマウス中で機能することが確認された。

表17. キメラマウス中のヒト抗体 $\kappa$ 鎖濃度(ELISA)

キメラマウス	キメラ率%	Ig $\kappa$ (mg/l)
K2-1F	100	66
K2-2F	100	156
K2-3F	100	99
K2-4F	100	20

(実施例42) ヒト2番染色体部分断片を保持するマウスES細胞(TT2F, X0)由来キメラマウスの子孫におけるヒト染色体保持の検出

(実施例40)で得られた雌キメラマウスのうちK2-1F, K2-4F(共に毛色のキメラ率100%)について雄ICRマウスとの交配によりES細胞由来の子孫が誕生するかを検討した。この交配においてICR雄マウス(アルビノ、劣性)由来精子により受精したキメラマウス中のTT2F細胞(野生色：優性)由来の卵子からは野生色、ICR由来卵子からは白色の子マウスが誕生する。それぞれ1回の交配によって得られた生存可能な子マウス(K2-1F: 10匹、K2-4F: 5匹)のすべてがES細胞由来の毛色である野生色を示した。これらの子マウスの尻尾より調製したゲノムDNAについてヒト染色体断片の保持をPCR法により検討した。P-21(実施例39)で存在が確認されている3種のプライマーについてPCR増幅を行なった結果、10匹中4匹(K2-1F)、5匹中2匹(K2-4F)においてP-21で検出された3種のマーカーの存在が確認された。15匹の子マウスのPCRの結果を(図21)に示す。図中

右側にマーカー（ $\phi$  X174, HaeIII断片, ニッポンジーン）および主なバンドのDNA分子量を、左側にそれぞれのプライマーによって期待される増幅産物の長さを矢印で示した。右側に陽性コントロールとして親キメラK2-1F、K2-4Fの尻尾由来DNAを用いた結果も示す。これらの結果は、ヒト2番染色体部分断片を保持するTT2F細胞株P-21がキメラマウス中で機能的な卵子に分化し、その卵子由来の子孫にヒト2番染色体部分断片が伝達されたことを示している。

(実施例43) ヒト2番染色体部分断片を保持するマウスES細胞(TT2, XY)由来キメラマウスの子孫におけるヒト染色体保持の検出

(実施例13) で得られたキメラマウスのうちK2-18(雄、キメラ率70%)とK2-19(雌、キメラ率60%)及び同腹の非キメラ雌を混合して交配し、ES細胞由来の子孫が誕生するかを検討した。TT2細胞は(40, XY)の染色体構成を持つので雄キメラK2-18において機能的な精子に分化している可能性がある。その場合キメラマウス中のTT2細胞(野生色、優性)由来精子により受精したICR(白色:劣性)由来の卵子からは野生色の子マウスが誕生する。交配によって得られた生存可能な子マウス計110匹のうち10匹がES細胞由来の毛色である野生色を示した。これらの野生色子マウス10匹のうち7匹の尻尾より調製したゲノムDNAについてヒト染色体断片の保持をPCR法により検討した。5-1株(TT2/#2fg., 実施例12)で存在が確認されている2種のプライマー(C $\kappa$ 、FABP1)及び、(実施例1)で示したV $\kappa$ 1-2プライマーについてPCR増幅を行なった結果、7匹中2匹において3種のマーカー全ての存在が確認された。この結果は、ヒト2番染色体部分断片を保持するTT2細胞株5-1がキメラマウス中で機能的な精子に分化し、その精子由来の子孫にヒト2番染色体部分断片が伝達されたことを示している。

(実施例44) キメラマウス子孫の血清中のヒト抗体 $\kappa$ 鎖の検出、および定量

(実施例42) のキメラマウス子孫K2-1F-1~10およびK2-4F-1~5の血清中のヒト抗体 $\kappa$ 鎖濃度をELISA法を用いて定量した。生後約4~6週齢のマウスより採血し、血清中のヒト抗体 $\kappa$ 鎖を(実施例20)と同様にELISA法を用いて検出した。結果を(実施例42)で得られた染色体保持の結果と共に表18に示す。キメラマウスから生まれた子孫においてもヒト抗体 $\kappa$ 鎖遺伝子が機能することが確認された。



表18. キメラマウス子孫中のヒト抗体  $\kappa$  鎖濃度 (ELISA)

親キメラマウス	マウス個体番号	ヒト2番染色体断片	Ig $\kappa$ (mg/l)
K2-1F	#1	-	0.58
K2-1F	#2	+	84.1
K2-1F	#3	+	12.8
K2-1F	#4	+	15.1
K2-1F	#5	-	0.52
K2-1F	#6	-	0.58
K2-1F	#7	-	1.30
K2-1F	#8	-	0.90
K2-1F	#9	-	0.56
K2-1F	#10	+	28.8
K2-4F	#1	-	0.04以下
K2-4F	#2	+	23.3
K2-4F	#3	+	11.8
K2-4F	#4	-	0.08
K2-4F	#5	-	0.06

(実施例45) ヒト14番染色体部分断片導入キメラマウス脾臓細胞の解析

フローサイトメトリーによる解析は下記の文献に記載の方法に従った。日本生化学会編、新生化学実験講座12分子免疫学I-免疫細胞・サイトカイン-1989、東京化学同人；東京大学医科学研究所 制癌研究部編、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール、1991、秀潤社；A. Doyle and J.B.Griffiths, "Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures", published by John Wiley & Sons Ltd., 1996。(実施例19)の生後6ヶ月齢のキメラマウス(KPG06；PG16由来、キメラ率30%)から脾臓をとりだし、塩化アンモニウム水溶液で処理した後ラッ

ト血清を1%含むPBS中で、フルオレッセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗マウスCD45R(B220)抗体 (ファーミンジェン、01124A) で細胞を染色した。洗浄後5%マウス血清を含むPBS中でビオチン標識抗ヒトIgM抗体 (ファーミンジェン、08072D) または対照としてビオチン標識抗ヒト $\lambda$ 鎖抗体 (ファーミンジェン、08152D) と反応させた後、ストレプトアビジンフィコエリスリン (ファーミンジェン、13025D) で染色し、フローサイトメトリー (ベクトンデッキンソン、FACSort) で解析した。また対照としてヒト染色体を保持しないICRマウスも同様に解析した。図22に結果を示す。図中横軸はヒトIgM、縦軸はCD45R(B220)を示す。B細胞マーカーCD45R陽性 (FITC) でかつヒトIgM陽性 (PE) である細胞集団が4%増加しており、これによってキメラマウスではヒト抗体 $\mu$ 鎖を細胞表面に発現している細胞の存在が確認された。

(実施例46) ヒト抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖をそれぞれ発現するキメラマウス脾臓由来cDNAからのヒト抗体遺伝子可変領域クローニングと塩基配列決定

(実施例29)、(実施例23)、(実施例32) においてヒト抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖をそれぞれ発現することが確認されたキメラマウスK15A (1-4株由来、実施例10に示した方法で作製)、K2-8 (実施例13で作製)、KPG22-2 (実施例31で作製) の脾臓由来RNAより (実施例5) と同様な方法で合成したcDNAについて、下記のプライマーによりPCRを行ない、それぞれのヒト抗体遺伝子可変領域を増幅した。陰性コントロールとして非キメラマウスICRより取得した脾臓由来cDNAを用いた。参考文献の記載のないプライマーはGenbank等のデータベースより入手した塩基配列をもとに作製した。

・ K15A (重鎖)

定常領域用: HIGMEX1-2 : 5'-CCAAGCTTCAGGAGAAAGTGATGGAGTC (配列番号53)

HIGMEX1-1 : 5'-CCAAGCTTAGGCAGCCAACGGCCACGCT (VH3BACKの2ndPCRに使用) (配列番号54)

可変領域用: VH1/5BACK (59°C, 35cycles, Marksら, Eur. J. Immunol., 21, 985-, 1991), VH4BACK (59°C, 35cycles, Marksら, 前記), VH3BACK (1stPCR: 59°C, 35cycles, 2ndPCR: 59°C, 35cycles, Marksら, 前記)

・ K2-8 (軽鎖  $\kappa$ )

定常領域用 : KC2H : 5'-CCAAGCTTCAGAGGCAGTTCCAGATTTTC (配列番号55)

可変領域用 : Vk1/4BACK (55°C, 40cycles, Marksら, Eur. J. Immunol., 21, 985-, 1991), Vk2BACK (55°C, 40cycles, Marksら, 前記), Vk3BACK (55°C, 40cycles, Marksら, 前記)

・ KPG22-2 (軽鎖  $\lambda$ )

定常領域用 : C  $\lambda$  MIX (以下の3種のプライマーを等モル比で混合したもの)

IGL1-CR : 5'-GGGAATTCGGGTAGAAGTCACTGATCAG (配列番号56)

IGL2-CR : 5'-GGGAATTCGGGTAGAAGTCACTTATGAG (配列番号57)

IGL7-CR : 5'-GGGAATTCGGGTAGAAGTCACTTACGAG (配列番号58)

可変領域用 : V  $\lambda$  1LEA1 (55°C, 40cycles, Williamsら, Eur. J. Immunol., 23, 1456-, 1993), V  $\lambda$  2MIX (55°C, 40cycles, 前記のWilliamsらの報告にあるV  $\lambda$  2LEA1, V  $\lambda$  2JLEAD を等モル比で混合したもの), V  $\lambda$  3MIX (55°C, 40 cycles, 前記のWilliamsらの報告にあるV  $\lambda$  3LEA1, V  $\lambda$  3JLEAD, V  $\lambda$  3BACK4を等モル比で混合したもの)

それぞれ定常領域用×可変領域用(重鎖3種、 $\kappa$ 鎖3種、 $\lambda$ 鎖3種)の組み合わせで94°C15秒、それぞれの可変領域プライマーに示したアニーリング温度15秒、72°C20秒、それぞれの可変領域プライマーに示したサイクル数(パーキンエルマー社、サーマルサイクラー9600使用)の条件で行なった。VH3BACKにおける2ndPCRは1stPCRの増幅産物を(HIGMEX1-1×VH3BACK)のプライマーの組み合わせで再度増幅した。全ての増幅産物は1.5%アガロース電気泳動後、臭化エチジウム染色することにより検出した。その結果、全て組み合わせにおいて、期待される長さ(重鎖:470bp付近、軽鎖 $\kappa$ :400bp付近、軽鎖 $\lambda$ :510bp付近)の増幅産物が検出された。一方、陰性コントロールでは全てにおいて同じ位置に特異的増幅産物は検出されなかった。これらの増幅産物は、アガロースゲルよりprep. A. gene (バイオラッド)により抽出した後、制限酵素処理(重鎖:HindIII-PstI、軽鎖 $\kappa$ :HindIII-PvuII、軽鎖 $\lambda$ :HindIII-EcoRI)し、pUC119(宝酒造)ベクターのHindIII, PstI部位(重鎖)、HindIII, HincII部位( $\kappa$ 鎖)、HindIII, EcoRI部位( $\lambda$ 鎖)にクローニングした。増幅産物の挿入されたプラスミドのうち

以下のもの（右側に示したクローン数）について、自動蛍光シーケンサー（Applied Bio System社）により、増幅産物の塩基配列を決定した。

- ・ HIGMEX1-2 × VH1/5BACK : 10クローン、
- ・ HIGMEX1-2 × VH4BACK : 8クローン、
- ・ HIGMEX1-2 (2nd PCR, HIGMEX1-1) × VH3BACK : 5クローン
- ・ KC2H × V $\kappa$  1/4BACK : 6クローン、
- ・ KC2H × V $\kappa$  2BACK : 7クローン、
- ・ KC2H × V $\kappa$  3BACK : 4クローン、
- ・ C $\lambda$  MIX × V $\lambda$  1LEA1 : 5クローン、
- ・ C $\lambda$  MIX × V $\lambda$  2MIX : 6クローン、
- ・ C $\lambda$  MIX × V $\lambda$  3MIX : 5クローン

得られた塩基配列をDNASIS(Hitachi Software Engineering)により解析した結果、全てがヒト由来配列であり、 $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖の全て、重鎖の計23種中21種が開始コドンから定常領域に至るまで終始コドンを含まない機能的配列であった。決定された配列からお互いに同一なものを除くと重鎖17種、 $\kappa$ 鎖11種、 $\lambda$ 鎖12種のそれぞれ異なる可変領域配列が同定された。

（実施例47）ヒト抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖をそれぞれ発現するキメラマウス脾臓由来cDNAからのヒト抗体遺伝子可変領域塩基配列の解析

（実施例46）において決定された塩基配列（重鎖17クローン、 $\kappa$ 鎖11クローン、 $\lambda$ 鎖12クローン）について以下の点について解析を行った。

1. 各可変領域配列において使用されている既知の生殖系列V遺伝子断片を特定
2. 各可変領域配列において使用されている既知の生殖系列J遺伝子断片を特定
3. 重鎖可変領域において使用されている既知の生殖系列D断片を特定
4. 1、2、3の結果をもとにした重鎖可変領域におけるN領域の付加の同定
5. 各可変領域塩基配列から導かれるアミノ酸配列の決定

その結果を（表19）に示す。1、2についてはGenbankに登録されている生殖系列V及びJ断片とのホモロジー検索をDNASISにより行い特定した。VH断片は

（Cookら, Nature genetics, 7, 162-, 1994）、V $\kappa$ 断片は（Kleinら, Eur. J.

Immunol, 23, 3248-, 1993)、V $\lambda$ 断片は(Williamsら, 前記)の表記法に従い、各V断片ファミリー名と共に表中に記した。3については(Ichiharaら, The EMBO J., 7, 13, 4141-, 1988)の報告に記された生殖系列D断片とのホモロジー検索をDNASISにより行い、連続して8bp以上一致することを指標として決定し表中に記した。DN\*については(Greenら, Nature Genetics, 7, 13-, 1994)で報告された新しいDNファミリー断片と考えられる。4については1(V)、2(J)、3(D)の結果をもとに、いずれの生殖系列断片にも見いだされない塩基配列をN領域とみなした。その結果、D領域の特定された13種中11種にN領域が観察され、その平均の長さは8.7bpであった。5については各塩基配列をDNASISを使用して1文字表記のアミノ酸配列に変換した。表中にはCDR3領域のみ示した。表中右側に各可変領域のクローニングに使用したプライマー名及び各クローン名を記した。

表19

V family	V segment	CDR3	J (D)	V primer	Clone
K15A					
VH1	VH1-8	VRSSSWYEYYYYGMDV	J6 (DN1)	VH4BACK	H4-10
	VH1-18	GGITMVRGLITDWFYDL	J2 (DXP'1)	VH1/5BACK	H1-7
	VH1-24	APYSGRFDY	J4 (DK1)	VH1/5BACK	H1-6
	VH1-46	ERYYGSGSYQDYYYYYGMDV	J6 (DXP'1)	VH1/5BACK	H1-2
	VH1-46	GGYSGYEDYYYYGMDV	J6 (DK1)	VH1/5BACK	H1-10
VH2	VH2-5	SYFDWPFDFY	J4 (DXP'1)	VH4BACK	H4-14
VH3	VH3-21	EGCSGSGSCLPGYYYYGMDV	J6 (DLR2)	VH1/5BACK	H1-4
	VH3-23	AHGDPYFDY	J4	VH1/5BACK	H1-3
	VH3-23	DADAFDI	J3	VH1/5BACK	H1-8
	VH3-23	SGWDY	J4 (DN1*)	VH3BACK	H3-3
	VH3-23	TGFDL	J2	VH4BACK	H4-4
	VH3-33	EGGYGSGVGDYYYYGMDV	J6 (DXP'1)	VH1/5BACK	H1-9
	VH3-33	GGYSYGYDYYYYGMDV	J6 (DXP'1)	VH3BACK	H3-5
	VH3-33	GYSSGWYDY	J4 (DN1*)	VH4BACK	H4-9
	VH4	RYSSGWYFYDY	J4 (DN1*)	VH4BACK	H4-15
	VH4-59	GRIAVASFDY	J4 (DN1*)	VH4BACK	H4-2
	VH4-59	GSGSYFHFDY	J4	VH4BACK	H4-6
K2-8					
V $\kappa$ 1	O18-8	QQHDNLPT	J3	V $\kappa$ 1BACK	K1-1
	O18-8	QQYDNLPT	J5	V $\kappa$ 1BACK	K1-3
	O18-8	QQHDNLPTA	J3	V $\kappa$ 2BACK	K2-2
	L1	QQYNSYPLT	J4	V $\kappa$ 1BACK	K1-6
V $\kappa$ 2	A17	MQGTHLLT	J4	V $\kappa$ 2BACK	K2-1
	A17	MQGTHWT	J5	V $\kappa$ 2BACK	K2-5
V $\kappa$ 3	A27	QQYGSSPTWT	J1	V $\kappa$ 3BACK	K3-1
	A27	QQYGSSPT	J3	V $\kappa$ 3BACK	K3-4
	A27	QQYGSSPLWT	J1	V $\kappa$ 3BACK	K3-5
	A27	QQYGSSPPWT	J1	V $\kappa$ 3BACK	K3-6
V $\kappa$ 6	A26-10	HQSSSLPQT	J1	V $\kappa$ 2BACK	K2-4
KPG22-2					
V $\lambda$ 1	DPL3	AAWDDSLDVV	JC3	V $\lambda$ 1LEA1	L1-3
	DPL5	GTWDSSLSAGV	JC2	V $\lambda$ 1LEA1	L1-4
	DPL5	GTWDSSLSAGVV	JC3	V $\lambda$ 1LEA1	L1-6
	DPL5	GTWDSSLSAVV	JC2	V $\lambda$ 1LEA1	L1-9
	DPL3	QSYDSSLSGVV	JC3	V $\lambda$ 1LEA1	L1-8
V $\lambda$ 2	DPL10	CSYAGSSTLV	JC2	V $\lambda$ 2MTX	L2-4
	DPL11	SSYTSSSTVV	JC2	V $\lambda$ 2MTX	L2-1
	DPL11	SSYTSSSTLV	JC2	V $\lambda$ 2MTX	L2-3
	DPL11	CSYTSSSTFV	JC2	V $\lambda$ 2MTX	L2-7
	DPL12	SSYAGSNNLV	JC3	V $\lambda$ 2MTX	L2-5
	DPL12	SSYAGSNNFVV	JC3	V $\lambda$ 2MTX	L2-6
V $\lambda$ 3	DPL16	NSRDSSGNLV	JC2	V $\lambda$ 3MTX	L3-1

(実施例48) TT2F ES細胞の抗体遺伝子(重鎖、軽鎖 $\kappa$ )ノックアウト用のターゲティングベクターの作製

マウス抗体遺伝子(重鎖、軽鎖 $\kappa$ )が破壊されたTT2(またはTT2F)細胞へG418耐性遺伝子でマーキングされたヒト14番染色体断片(実施例9)およびピューロマイシン耐性遺伝子でマーキングされたヒト2番(実施例18)または22番染色体(実施例35)を導入することが可能となる。このようなヒト14番+2番またはヒト14番+22番染色体を導入したマウス抗体(重鎖、軽鎖 $\kappa$ )遺伝子破壊TT2(またはTT2F)ES細胞を用いて、(重鎖+ $\kappa$ 鎖:実施例19、重鎖+ $\lambda$ 鎖:実施例36)の方法によって作成されたキメラマウスでは、主に重鎖と軽鎖がヒト由来の抗体が産生されることが期待される。以下に示す図23～図27における制限酵素の略称等は、以下のとおりである。

制限酵素: Kp: KpnI、B: BamHI、Bg2: BglII、RI: EcoRI、RV: EcoRV、N: NotI、S1: Sall、Sca: ScaI、Sfi: SfiI、Sm: SmaI、X: XhoI、(X):ラムダベクター由来のXhoI切断部位、

dK: KpnI切断部位を消失、dX: XhoI切断部位を消失、

(Sm/S1): Sall 平滑後SmaI切断部位と結合、(S1/RV): Sall 平滑後EcoRV 切断部位と結合。

点線部分: pBluescript SKII(+) またはpUC18 プラスミドDNA

◁▷: LoxP配列

#### 1. G418耐性遺伝子の両側にLoxP配列を入れたpLoxP-STneo プラスミドの作製

TT2F細胞の抗体遺伝子をノックアウトした後、G418耐性遺伝子を除去するためにG418耐性遺伝子(実施例1)の両端にCreリコンビネース(Sauerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5166-, 1988)の認識配列であるLoxP配列(Sauerら、前記)を同じ向きに入れる必要がある。pSTneoBプラスミドDNA(実施例1、Katohら、Cell Struct. Funct., 12:575, 1987; Japanese Collection of Research Biologicals (JCRB), Deposit Number: VE039)より制限酵素XhoIでG418耐性カセット(STneo)を切り出し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を精製したのちT4DNAポリメラーゼ(Takara社製 DNA Blunting Kit)により両端を平滑

化した。LoxP配列が入ったプラスミドDNA pBS246 (Plasmid pBS246, loxP2 Cassette Vector, U. S. Patent 4959317) は、GIBCO BRL社より購入した。このプラスミドのEcoRI及びSpeI切断部位へXhoIリンカーDNAを挿入することによってXhoI認識配列に変更したものを使用した。この改変pBS246のEcoRV切断部位へ上記STneo DNA断片を挿入してプラスミドpLoxP-STneoを得た(図23)。

2. C57BL/6由来抗体重鎖C $\mu$  (IgM定常領域)、軽鎖J $\kappa$ -C $\kappa$  (Ig $\kappa$ 連結領域および定常領域)を含むゲノムDNAクローンの単離

TT2(またはTT2F)細胞は、C57BL/6マウスとCBAマウスのF1マウス由来であることから、C57BL/6マウス由来のゲノムDNAクローンを用いて抗体遺伝子ノックアウト用ベクターを作製することにした。ゲノムDNAライブラリーは、Clontech社adult C57BL/6N male liver由来ラムダDNAライブラリーを使用した。スクリーニングのためにプローブとしては、以下の合成DNA配列(60 mer)を用いた。  
重鎖C $\mu$ プローブ: 5'-ACC TTC ATC GTC CTC TTC CTC CTG AGC CTC TTC TAC AGC ACC ACC GTC ACC CTG TTC AAG-3' (配列番号59)  
軽鎖 $\kappa$ プローブ: 5'-TGA TGC TGC ACC AAC TGT ATC CAT CTT CCC ACC ATC CAG TGA GCA GTT AAC ATC TGG AGG-3' (配列番号60)

単離されたラムダクローンを解析して、重鎖C $\mu$ または軽鎖J $\kappa$ -C $\kappa$ を含むDNA断片をpBluescript SKII(+) プラスミド(Stratagene社)へサブクローニングした(重鎖C $\mu$ : 図24; 軽鎖J $\kappa$ -C $\kappa$ : 図25)。これらのDNA断片を用いて、以下のようにTT2(またはTT2F)ES細胞中のマウス抗体遺伝子破壊のためのターゲティングベクターを作製した。

3. マウス抗体重鎖遺伝子破壊用ベクタープラスミドの作製

2で調製したマウス抗体重鎖定常領域を含むゲノムDNAのC $\mu$ をコードする領域の中で、第2～第4エクソンが含まれるDNA断片(BamHI～XhoI)を1で作製したLoxP-STneo遺伝子と置き換えた(図26)。STneoの転写方向は、抗体重鎖遺伝子の転写方向と同じ向きとなっている。更にこのプラスミドのNotI部位に、DT-AカセットA(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9918-9922, 1990, オリエンタル酵母より購入)[以下、DTと呼ぶ]のApaI、SalI部位をNotI部位に変換したものを挿入した。DT遺伝子の転写方向は、重鎖遺伝子の転写方向と同じ向きとなるもの



を選択した。このプラスミドDNAは、大腸菌DH5を用いて増幅し、セシウムクロライド平衡遠心により精製した（細胞工学実験操作入門、1992年講談社刊）。精製したプラスミドDNAは、制限酵素SacIIにより、一箇所切断してTT2F ES細胞へのトランスフェクションに使用した。形質転換体TT2F ES細胞の中から抗体重鎖部分がターゲティングベクターと相同組換えが起こったクローンを検出するための形質転換体ゲノムDNAサザンブロット用のプローブとして、C $\mu$ の上流に存在するスイッチ領域のDNA断片（約500塩基対）を用いた。このDNA断片は以下の条件で129マウスゲノムDNAをPCR増幅して得た。

センスプライマー：5'-CTG GGG TGA GCC GGA TGT TTT G-3'（配列番号61）

アンチセンスプライマー：5'-CCA ACC CAG CTC AGC CCA GTT C-3'（配列番号62）

テンプレートDNA：EcoRI消化129マウスゲノムDNA 1 $\mu$ g

反応バッファー、デオキシヌクレオチドミックス、TaqDNAポリメラーゼは、Taka-ra社製のものを使用。

反応条件：94度C, 3分, 1回 → 94度C, 1分；55度C, 2分；72度C, 2分；3回  
→ 94度C, 45秒；55度C, 1分；72度C, 1分；36回

増幅されたDNAがGenbankのデータベースにあるとおり、制限酵素HindIIIで一箇所切断されることを確認して、pBluescriptプラスミドのEcoRV切断部位へサブクローニングした。このプラスミドDNA（S8）を制限酵素BamHIとXhoIで切断して、アガロースゲル電気泳動でPCR断片（約550塩基対）を精製したものをプローブとした。ターゲティングベクターで形質転換したTT2F ES細胞のゲノムDNAを制限酵素EcoRIとXhoIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、上記プローブで検出した。

#### 4. マウス抗体遺伝子軽鎖 $\kappa$ 破壊用ベクターの作製

2で調製したマウス抗体軽鎖 $\kappa$  J領域および定常（C）領域を含むゲノムDNAのC領域が含まれるDNA断片（SacII～BglIII）を1で作製したLoxP-STneo遺伝子のKpnI部位をつぶしたものと置き換えた（図27）。STneoの転写方向は、抗体遺伝子の転写方向と逆向きとなっている。このプラスミドDNAは以下のように構築した。pUC18プラスミドのマルチクローニング部位の配列（EcoRI-HindIII）をDNA化学合成によって作製した配列：

5'-AATTCCTCGGGTCGACGGATCCCTCGAGGGTACCA -3' (配列番号 6 3)

3'-GGGCGCCCAGCTGCCTAGGGAGCTCCCATGGTTCGA-5' (配列番号 6 4)

EcoRI SacII SalI BamHI XhoI KpnI HindIII

に変換した。このプラスミドのEcoRI、SacII 部位へJ $\kappa$ を含むEcoRI～SacII DNA断片(図25)を挿入した。次に、できたプラスミドのBamHI、XhoI部位へ3'-側 BglIII～BglIII～BglIII～XhoI DNA断片(図25)を挿入した。このプラスミドのXhoI部位、SalI部位に順次、DTを含むXhoI～SalI DNA断片、KpnI断片を漬したLoxP-STneoを含むXhoI DNA断片を挿入した。DT遺伝子の転写方向は、軽鎖 $\kappa$ 遺伝子の転写方向と同じ向きとなる。このプラスミドDNAは、大腸菌DH5を用いて増幅し、セシウムクロライド平衡遠心により精製した。精製したプラスミドDNAは、制限酵素KpnIにより、一箇所切断してTT2F ES細胞へのトランスフェクションに使用した。形質転換体TT2F ES細胞の中から抗体軽鎖部分がターゲティングベクターと相同組換えが起こったクローンを検出するための形質転換体ゲノムDNAサザンブロット用のプローブとして、軽鎖J $\kappa$ -C $\kappa$ ゲノムDNA(図25参照)の3'端のDNA断片(XhoI～EcoRI; 約1.4k塩基対)を用いた。ターゲティングベクターで形質転換したTT2F ES細胞のゲノムDNAを制限酵素EcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、上記プローブで検出した。

#### (実施例49) マウスES細胞抗体重鎖遺伝子破壊株の取得

抗体重鎖遺伝子相同組換え体取得の為、実施例48-3で作成した抗体重鎖ターゲティングベクターを制限酵素SacII(宝酒造)で線状化し、(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲティング, 羊土社, 1995)の方法に従いマウスES細胞TT2Fへ導入した。TT2F細胞をトリプシン処理し、 $2.5 \times 10^7$ 個/mlとなるようにHBSに懸濁してから $5 \mu\text{g}$  DNAを加え、ジーンパルサー(バイオラッド、抵抗器ユニット接続せず)を用いてエレクトロポレーションを行なった。 $960 \mu\text{F}$ の容量で250Vの電圧を4mm長のエレクトロポレーションセルを用いて室温で印加した。エレクトロポレーションした細胞を20mlのES培地に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞をまいた100mm組織培養用プラスチックシャーレ(コーニング)

2枚に播種した。同様に10, 15  $\mu$ g DNAを用いた実験も行った。1日後に300  $\mu$ g/mlのG418 (GENETICIN, シグマ) を含む培地と置き換えた。7~9日後に生じたコロニー計176個をピックアップし、それぞれを12穴プレートでコンフルエントになるまで増殖させ、その4/5を0.2mlの保存用培地 (ES培地+10%DMSO<シグマ>) に懸濁し、-80°Cにて凍結保存した。残りの1/5は12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養して、 $10^6 \sim 10^7$  個の細胞からゲノムDNAをPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System社) により調製した。これらのG418耐性TT2F細胞ゲノムDNAを制限酵素EcoRIとXhoI (宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、実施例48-3に示したプローブで相同組換え体を検出した。その結果176株中3株が相同組換え体であるという結果を得た。野生型TT2F細胞及び相同組換え体#131、#141のサザンブロット解析の結果を(図28) 左側3レーンに示す。野生型TT2F細胞ではEcoRI、XhoI消化により2本のバンド(a、b) が検出された。相同組換え体においては、これらのいずれかのバンドが消失し、新たに下部にバンド(c) が現われることが予想される。図中#131、#141においてaのバンドが消失し、新たにcのバンドが出現している。図中左側にはDNAの大きさを示した。すなわちこれらのクローンは抗体重鎖遺伝子の片方のアレルが相同組換えにより破壊されたものである。

#### (実施例50) 抗体重鎖相同組換え体ES細胞からのキメラマウス作成

(実施例49) で得られた抗体重鎖相同組換え体TT2F細胞株#131を凍結ストックより立ち上げ、ICRまたはMCH(ICR) (日本クレア社) 雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10~12個注入した。ES細胞用培地 (実施例9) で一晚培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス (日本クレア社) の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。計94個の注入胚を移植した結果、22匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚 (ICR) 由来の白色の中にTT2F細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうかにより判定される。誕生した22匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は18匹であった。うち16個体は毛色の80%以上が野生色の (ES細胞に由来する) 雌キメラマウスであっ

た。この結果より、抗体重鎖相同組換え体ES細胞株#131はキメラ形成能を保持していることが確認された。得られたキメラマウスのうち多くの個体は非常に高い貢献率を示す雌であるので、ES細胞が機能的な生殖細胞（卵子）に分化している可能性が高い。キメラマウスのうち100%の貢献率を示す雌キメラ2個体をMCH(ICR)雄マウスと交配した結果、生まれた子マウスはすべて野性色を示した。これらの子マウスは#131由来であり（実施例42参照）、2匹に1匹の割合で破壊された抗体重鎖アレルが伝達していると考えられる。

#### （実施例51）抗体重鎖相同組換え体からの2重破壊株の取得

片側アレルがG418耐性遺伝子の挿入により破壊されたES細胞株において、培養液中のG418濃度を上げて培養することにより得られる高濃度G418耐性株をスクリーニングすれば両側アレル共に破壊された株を取得することが可能なことが報告されている（相沢慎一ら、バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲットイング, 羊土社, 1995）。これに基づき、我々はTT2F抗体重鎖相同組換え体#131, #141について両側アレルの破壊株取得の為、以下の実験を行った。まず、#131, #141両株について致死G418濃度検定のため35mmシャーレ各10枚（この実施例においては栄養細胞はマイトマイシン処理をしていないG418耐性初代培養細胞（ライフテックオリエンタル社より購入）を使用した。実施例9参照）に1枚あたり約100個の細胞を播種し、0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20 mg/ml のG418（GENETICIN、シグマ）をそれぞれ含むES培地中で10日間培養した。その結果3mg/mlの濃度までは明らかなコロニーが認められたが、5mg/mlではコロニー形成は認められなかった。この結果をもとに最小致死濃度を5mg/mlと決定し、4, 5, 6, 7, 8mg/mlの各濃度で高濃度G418耐性株の選抜を行った。#131, #141それぞれについて100mmシャーレ計10枚に1枚当たり約 $10^6$ 個の細胞を播種し、上記の各濃度のG418を含むES培地（5段階、各濃度シャーレ2枚づつ）により培養した。培養開始12日後に7mg, 8mg/mlのシャーレにおいて明らかなコロニー（#131: 12株、#141: 10株）をピックアップし、実施例49と同様に凍結保存、DNA取得を行った。これらの高濃度G418耐性株ゲノムDNAを制限酵素EcoRIとXhoI（宝酒造）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、実施例48-3に示したブ

ローブで両側アレルの破壊された株を検出した。その結果#131株由来の1株（#131-3）が両側アレル破壊株であるという結果を得た。#131由来の6株についてのサザンブロット解析の結果を（図28）に示す。野生型TT2F細胞ではEcoRI、XhoI消化により2本の野生型バンド（a、b）が検出された。片側アレル相同組換え体（#131、#141）においては、上部のバンドaが消失し、新たにバンドcが現われた（実施例49）。さらに両側アレルが破壊されることにより、もう一方の野生型バンドbが消失し、破壊型バンドcのみとなることが予想される。図中3（#131-3）のクローンにおいてこのバンドパターンが観察された。すなわちこのクローンは抗体重鎖遺伝子の両方のアレルが破壊されたものである。

（実施例52）抗体重鎖欠損ホモ接合体TT2F細胞株からのG418耐性マーカー遺伝子の除去

実施例51で取得された抗体重鎖両側アレル破壊株（高濃度G418耐性株#131-3）のG418耐性マーカー遺伝子を以下の手順により除去した。G418耐性マーカー遺伝子の両側に挿入したloxP配列（実施例48-1）の間で部位特異的組換えを起こすCreレコンビナーゼ遺伝子を含む発現ベクターpBS185（BRL）を（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995、及び高津聖志ら、実験医学別冊、免疫研究の基礎技術、p255-、1995、羊土社）の方法に従い#131-3株へ導入した。#131-3細胞をトリプシン処理し、 $2.5 \times 10^7$ 個/mlとなるようにHBSに懸濁してから30  $\mu$ gのpBS185DNAを加え、ジーンパルサー（バイオラッド、抵抗器ユニット接続せず）を用いてエレクトロポレーションを行なった。960  $\mu$ Fの容量で250Vの電圧を4mm長のエレクトロポレーションセル（165-2088、バイオラッド）を用いて印加した。エレクトロポレーションした細胞を5mlのES培地に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞をまいた60mm組織培養用プラスチックシャーレ（コーニング）1枚に播種した。2日後に細胞をトリプシン処理し、フィーダー細胞をまいた100mmシャーレ3枚にそれぞれシャーレ1枚当たり100、200、300細胞となるように再度播種した。ジーンパルサーの設定（抵抗器ユニット接続、抵抗値無限大）のみ変更した条件でも同様に行った。7日後に生じたコロニー計96個をピックアップし、トリプシン処理した後2つに分け、フィーダー細胞

をまいた48穴プレート及びゼラチンコート処理のみを行った48穴プレート2枚にそれぞれ播種した。後者は300  $\mu$ /mlのG418 (GENETICIN、シグマ)を含む培地で3日間培養し、その生存率でG418耐性を判定した。その結果6クローンがG418存在下で死滅した。これらのG418感受性株を35mmシャーレでコンフルエントになるまで増殖させ、その4/5を0.5mlの保存用培地 (ES培地+10%DMSO<シグマ>)に懸濁し、-80°Cにて凍結保存した。残りの1/5は12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養して、 $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞からゲノムDNAをPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System社)により調製した。これらのG418感受性TT2F細胞株ゲノムDNAを制限酵素EcoRI (宝酒造)で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、G418耐性遺伝子を含むpSTneoB由来3.2kb XhoI断片 (プローブA)でG418耐性遺伝子の除去を確認した。その結果、#131-3において観察される、プローブAとハイブリダイズするバンドが、感受性株においては全く検出されなかった。これらの結果より、取得されたG418感受性株において確かにG418耐性マーカー遺伝子が除去されていることが確認された。さらに上記と同様な方法でpBS185DNAをEcoRI消化したプローブBを用いてサザン解析を行った結果、これらG418感受性株にプローブBとハイブリダイズする特異的なバンドは検出されなかったことから、Creレコンビナーゼを含むpBS185は感受性株染色体に挿入されていないと考えられる。すなわち、これらの感受性株は実施例48-4に示した抗体軽鎖ノックアウトベクター (G418耐性遺伝子の両側に10xP配列が存在する)による形質転換を行うことができる。このG418感受性株#131-3-5より実施例40の方法に従って、キメラマウスを作製した。その結果、毛色のキメラ率100%のマウスが得られた。

(実施例53) 抗体重鎖欠損ES細胞株へのヒト14番染色体 (抗体重鎖) の導入

(実施例52)で得られた、内在性の抗体重鎖を欠損するマウスES細胞株 (TT2F由来、G418感受性)に (実施例9)で示した通りにG418耐性遺伝子によりマーキングされたヒト14番染色体 (抗体重鎖遺伝子を含む)をマイクロセル法により導入する。得られるG418耐性株においてPCR解析等 (実施例9)によりヒト抗体重鎖遺伝子を含むヒト14番染色体 (断片)の保持が確認される。

(実施例54) ヒト14番染色体(断片)を保持する抗体重鎖欠損ES細胞株へのヒト2番染色体断片あるいは22番染色体の導入

(実施例53) で得られた、ヒト14番染色体断片を保持する抗体重鎖欠損マウスES細胞株(G418耐性)に(実施例18、35)で示した通りにピューロマイシン耐性遺伝子によりマーキングされたヒト2番染色体断片(抗体軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む)あるいはヒト22番染色体(抗体軽鎖 $\lambda$ 遺伝子を含む)をマイクロセル法により導入する。得られるピューロマイシン、G418二重薬剤耐性株においてPCR解析等(実施例18、35)によりヒト14番染色体(断片)及び2番染色体断片あるいは22番染色体(断片)の保持が確認される。

(実施例55) ヒト抗体重鎖遺伝子を含む14番染色体(断片)を保持する内在性抗体重鎖欠損マウスES細胞からのキメラマウス作成

(実施例53) で取得されるヒト抗体重鎖遺伝子を含む14番染色体(断片)を保持する内在性抗体重鎖遺伝子欠損マウスES細胞株からのキメラマウス作成は(実施例10)で示した方法により行う。ここで得られるキメラマウスにおいては、ES細胞株由来のB細胞で産生されるヒト抗体重鎖が(実施例14)で示した方法により検出される。また、このES細胞由来のB細胞において機能的な抗体重鎖遺伝子は導入染色体上のヒト由来のもののみであるので、ES細胞株由来B細胞の多くはヒト抗体重鎖を産生する。

(実施例56) ヒト14番+2番、14番+22番染色体(断片)を保持する内在性抗体重鎖欠損マウスES細胞からのキメラマウス作成

(実施例54) で取得されるヒト14番+2番、14番+22番染色体(断片)を保持する内在性抗体重鎖遺伝子欠損マウスES細胞株からのキメラマウス作成は(実施例19、36)等で示した方法により行う。ここで得られるキメラマウスにおいては、ES細胞株由来のB細胞でヒト抗体重鎖及び軽鎖 $\kappa$ あるいは軽鎖 $\lambda$ が(実施例14、23、32)で示した方法により検出される。また、(実施例55)と同様にこのES細胞由来のB細胞において機能的な抗体重鎖遺伝子は導入染色体上のヒト由来のも

のみであるので、ES細胞由来B細胞の多くはヒト抗体重鎖を産生する。さらに、（実施例37、38）で示したように重鎖、軽鎖が共にヒト由来である完全なヒト抗体分子が検出される。

（実施例57）ヒト14番+2番、14番+22番染色体（断片）を保持する内在性抗体重鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウスからのヒト抗体産生ハイブリドーマ取得

（実施例15、25、34）と同様に（実施例56）で作成されるキメラマウスに目的とする抗原で免疫し、脾臓を取り出し、ミエローマ細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを作成する。1～3週間培養し培養上清をELISA法で解析する。ELISA法は（実施例14、15、21、24、25、33、34、37、38）に示した方法で行ない、ヒト抗体陽性及びヒト抗体陽性かつ免疫した抗原特異的クローンを得る。

（実施例58）抗体重鎖欠損ホモ接合体マウスES細胞からの抗体軽鎖遺伝子破壊株の取得

実施例52で取得した抗体重鎖欠損ホモ接合体TT2F細胞株（G418感受性）においてさらに抗体軽鎖遺伝子を破壊した相同組換え体を以下の手順で取得した。実施例48-4で作製した抗体軽鎖ターゲティングベクターを制限酵素KpnI（宝酒造）で線状化し、（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995）の方法に従い実施例49と同様に上記TT2F細胞株（G418感受性）へ導入した。すなわち、細胞をHBSに懸濁し、 $2.5 \times 10^7$  cells/mlの懸濁液とした後、DNA 5  $\mu$ g を0.5 mlの細胞懸濁液に加え、エレクトロポレーションセルに960  $\mu$ F、250 V の電圧を印加した。7～9日後に生じたコロニーをピックアップし、実施例49に示した方法で凍結保存、ゲノムDNAを取得した。G418耐性株ゲノムDNAを制限酵素EcoRI（宝酒造）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロット解析を行ない、実施例48-4に示したプローブで相同組換え体を検出した。結果を図29に示す。親株である抗体重鎖欠損ホモ接合体TT2F細胞ではEcoRI 消化により1本のバンド(a)が検出された。相同組み換え体においては、このバンドに加えて新たに下部にバンド(b)が現れることが予想される。図中、形質転換株2、5において(b)のバンドが出現している。図中、左側にはDNAの大



きさを示した。すなわち、これらのクローンは抗体軽鎖遺伝子の片方のアレルが相同組み換えによって破壊されたものである。解析した120株中28株の相同組み換え体を得た。これらのクローンは、通常の培養条件において、遺伝子破壊以前のTT2F株と比較して、増殖速度および形態に変化が見られず、キメラマウス形成能を保持していることが示唆される。

(実施例59) 抗体軽鎖相同組換え体からの2重破壊株の取得

実施例58で得られたTT2F抗体軽鎖相同組換え体（かつ抗体重鎖欠損ホモ接合体）について軽鎖両側アレルの破壊株を以下の手順により取得した。実施例51と同様な方法で高濃度G418耐性株を取得した。G418濃度9～14 mg/mlの5～7日間培養を行った後、G418濃度を4 mg/ml に下げ培養し、培養開始から10～13日後に生じたコロニーをピックアップし、実施例51と同様な方法で凍結保存、DNA取得を行なった。高濃度G418耐性株ゲノムDNAを制限酵素EcoRIとNotI（宝酒造）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、実施例48-4に示したプローブで両側アレルの破壊された株を検出した。サザンブロット解析の結果を図32に示す。2重破壊株では図32の(a)のバンドが消失し、バンド(b)のみになることが予想される。図中、高濃度G418耐性株2、3、8においてバンドが消失している。すなわち、これらクローンは抗体軽鎖遺伝子の両側のアレルが破壊されたものである。それぞれ独立した片側アレル破壊株3株から得られた高濃度耐性株を解析し、それぞれ59株中36株、43株中2株、49株中1株の抗体軽鎖遺伝子の両側のアレルが破壊されたクローンを取得した。これらのクローンは、通常の培養条件において、遺伝子破壊以前のTT2F株と比較して、増殖速度および形態に変化が見られず、キメラマウス形成能を保持していることが示唆される。

(実施例60) 抗体軽鎖欠損ホモ接合体（かつ抗体重鎖欠損ホモ接合体）TT2F細胞株からのG418耐性マーカー遺伝子の除去

実施例59で取得された抗体軽鎖両側アレル破壊株（高濃度G418耐性株）のG418耐性マーカー遺伝子を実施例52で示した手順により除去した。G418耐性マーカー遺伝子の両側に挿入したloxP配列（実施例48-1）の間で部位特異的組換えを起こ

すCreレコンビナーゼ遺伝子を含む発現ベクターpBS185 (BRL) を実施例52の方法に従い上記の株へ導入した。実施例52と同様に得られるG418感受性株を35mmシャーレでコンフルエントになるまで増殖させ、その4/5を0.5mlの保存用培地 (ES培地+10%DMSO<シグマ>) に懸濁し、-80℃にて凍結保存した。残りの1/5は12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養して、 $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞からゲノムDNAをPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System社) により調製した。これらのG418感受性TT2F細胞ゲノムDNAを制限酵素EcoRI (宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、G418耐性遺伝子を含むpSTneoB由来3.2kbXhoI断片をプローブとし、G418耐性遺伝子の除去を確認した。

#### (実施例61)

(1) 内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損ES細胞株へのヒト14番染色体断片 (抗体重鎖遺伝子を含む) の導入

(実施例78) で得られた内在性の抗体重鎖及び $\kappa$ 鎖の両者を欠損するマウスES細胞株 (TT2F由来、G418、ピューロマイシン感受性) HKD31に (実施例68-(2)) に示す通りヒト14番染色体断片SC20 (ヒト抗体重鎖遺伝子を含む) をマイクロセル法により導入した。マイクロセル融合およびG418耐性株の選択は (実施例2) と同様に行った。得られたG418耐性株のうち8株についてIgM、D14S543プライマーを用いたPCR解析 (実施例68) を行った結果、7株中8株において両者が検出された。よってこれらの抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損ES細胞株は、ヒト14番染色体断片SC20を保持していることが確認された。

(2) ヒト14番染色体断片 (抗体重鎖遺伝子を含む) を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞からのキメラマウス作成

実施例61-(1) で取得されたヒト14番染色体断片 (抗体重鎖遺伝子を含む) を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞株HKD31-8からのキメラマウス作成は (実施例10) 等で示した方法により行った。計188個の注入胚を移植した結果、25匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚 (ICR) 由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうか

により判定される。誕生した25匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は17匹であった。うち3個体は毛色がほぼ完全（95%以上）に野生色の（ES細胞に由来する）キメラマウスであった。

この結果より、ヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞株はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

（3）ヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウス血清におけるヒト抗体（ヒト $\mu$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 鎖を有する抗体）の検出

実施例61-（2）で作製したキメラマウス（HKD31-8由来）から生後12週齢（ $\#1$ ）または生後7週齢（ $\#2\sim4$ ）に採血し、血清中のヒト抗体濃度を（実施例14）に従いELISA法で定量した。PBSで希釈した抗ヒト免疫グロブリン $\mu$ 鎖抗体（シグマ、I6385）、あるいは抗ヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖抗体（シグマ、I3382）あるいは抗ヒト免疫グロブリン $\alpha$ 鎖抗体（Pharmingen、08091D）を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、マウス血清（シグマ、M5905）を加えたPBSで希釈した血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\mu$ 鎖抗体（The Binding Site Limited、MP008）あるいはペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖抗体（シグマ、A0170）を加えてインキュベートした。あるいはビオチン標識抗ヒト免疫グロブリン $\alpha$ 鎖抗体（Pharmingen、08092D）を加えてインキュベートした後、プレートを洗浄し、アビジン-ペルオキシダーゼ複合体（Vector、ABCキットPK4000）を加えてインキュベートした。ペルオキシダーゼ基質としてTMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価し、精製された $\mu$ 鎖、 $\gamma$ 鎖、 $\alpha$ 鎖を持つ濃度既知のヒトイムノグロブリンIgM（CAPPEL、6001-1590）、IgG（シグマ、I4506）、IgA（シグマ、I2636）をマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈したものと比較し血清中のヒト抗体濃度を求めた。結果を表20に示す。ヒト抗体 $\mu$ および $\gamma$ 鎖濃度が、通常のマウス血清中の抗体濃度とほぼ同レベルに高い、キメラマウス個体が確認された。またヒト $\alpha$ 鎖を発現するキメラマウス個体が確認された。さらに（実施例29）の方法に従い、ヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖サブクラスを検

出し、4種のサブクラス ( $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ )すべてが検出された。

この結果からヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウスにおいてヒト抗体重鎖遺伝子が効率良く発現し、 $\mu$ 鎖さらにはクラススイッチによってすべての $\gamma$ 鎖サブクラスおよび $\alpha$ 鎖も発現することが示された。

表20 キメラマウス中のヒト抗体濃度 (ELISA)

キメラマウス	キメラ率%	ヒト抗体 (mg/l)		
		IgM	IgG	IgA
#1	90	270	1250	0.46
#2	99	370	820	0.23
#3	99	550	1460	0.32
#4	95	340	2300	0.06

(4) ヒト14番染色体断片 (抗体重鎖遺伝子を含む) を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウスからのヒト $\gamma$ 鎖を含む抗HSA抗体産生ハイブリドーマの取得

実施例61-(3) で血清中のヒト抗体 $\gamma$ 鎖濃度が高いキメラマウス#3 (HKD31-8由来、キメラ率99%) および#4 (キメラ率95%) に対して、生後16週齢からPBSに溶解したヒト血清アルブミン (HSA、シグマ、A3782) とアジュバント (MP L+TDM Emulsion, RIBI Immunochem Reseach Inc.) とを混合して0.25mg/mlのHSA溶液を調整し0.2mlを2週間おきに2回腹腔に免疫し、さらに2週間後にPBSに溶解したヒト血清アルブミンを免疫し、採血した。血清中の抗HSAヒト抗体濃度を (実施例14) に従いELISA法で検出した。HSAをコーティングし、ペルオキシダーゼ標識した抗ヒトIg $\mu$ 抗体 (The Binding Site, MP008)、抗ヒトIg $\gamma$ 抗体 (シグマ、A1070)、抗ヒトIg $\alpha$ 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., 14-10-01) を用いて検出した。結果を図33に示す。ハイブリドーマの作製法はく安東、単クローン抗体実験操作入門、講談社サイエンティフィク、1991> に記された方法に従い、ミエローマ細胞としては、SP-2/O-Ag14 (大日本製薬) を使用した。最終免疫の3日後に、キメラマウスからひ臓を取り出し、(実施例24) に従いPEGにて細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。同時に採血し、(実施例29) の方法に従い、血清中のヒトIg $\gamma$ サブクラスの定量を行った。キメラマウス#3の血清中には $\gamma 1$  が920mg/l、 $\gamma 2$  が520mg/l、 $\gamma 3$  が11mg/l、 $\gamma 4$  が140mg/l 存在した。

融合後の細胞を、ひ細胞数が100万個/mlとなるよう、HCF（エア・ブラウン）を5%添加し、HAT（大日本製薬、No.16-808-49）あるいは1mg/mlのG418を添加した培地（三光純薬、エス・クロンクローニングメデュームCM-B）に希釈し、各wellに100  $\mu$  lずつ96穴プレート分注し培養した。培養8日目に培養上清を採取し、（実施例14）に従いELISA法によってヒト抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。CBB緩衝液に溶解し5  $\mu$  g/mlとしたHSA溶液をコーティングし、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖抗体（シグマ、A0170）を用いてTMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）により検出した。陰性対照の約3倍以上の吸光度を目安にして判定し、キメラマウス#3より74個、キメラマウス#4より29個の陽性ウエルを得た。またHSA溶液をコーティングし、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\mu$ 鎖抗体（Tago、#2392）を用いてヒト $\mu$ 鎖を持つ抗HSA抗体をスクリーニングした。キメラマウス#3の融合処理細胞をまきこんだ96穴プレート15枚の中でG418選択を行ったプレート4枚の培養上清をスクリーニングし5個の陽性ウエルを得た。HATあるいは1mg/mlのG418による選択でコロニー出現したウエルはプレート1枚あたり各々、74個および29個であった。ヒト $\gamma$ 鎖を持つ抗HSA抗体陽性で、細胞数が比較的多いウエルの細胞を48穴プレートに移しさらに4日間培養し、培養上清中の抗体のアイソタイプをELISAにより決定した。HSA溶液をコーティングし、アルカリフォスファターゼ標識した抗ヒトIgG1抗体（Zymed laboratories, Inc.、05-3322）、抗ヒトIgG2抗体（Zymed laboratories, Inc.、05-3522）、抗ヒトIgG3抗体（Zymed laboratories, Inc.、05-3622）、抗ヒトIgG4抗体（Zymed laboratories, Inc.、05-3822）を用いて（実施例14）に従いELISAを行い判定した。陽性クローンはヒトIgG1が27、IgG2が11、IgG3が2、IgG4が13クローンあった。キメラマウス#4の融合処理細胞も同様に判定し、細胞数の多いクローン4株を判定し、ヒトIgG1産生クローンを得た。

この結果よりヒト抗体遺伝子（重鎖）を含む14番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、軽鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウスにヒトのタンパク（HSA）を免疫することによって、抗原特異的ヒトIg $\mu$ 、 $\gamma$ および $\alpha$ 抗体価の上昇が起り、 $\mu$ 鎖およびすべてのヒト $\gamma$ 鎖サブクラスを含む抗HSA抗体産生ハイブリド

ーマの取得が可能であることが示された。

（実施例62）ヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞へのヒト2番染色体（軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む）の導入

実施例61-（1）で得られた、内在性抗体重鎖及び $\kappa$ 鎖欠損かつヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）を保持するマウスES細胞株HKD31-8に（実施例18）で示した通りにピューロマイシン耐性遺伝子でマーキングされたヒト2番染色体断片（抗体軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む）をマイクロセル法により導入した。その結果得られたピューロマイシン、G418二重耐性株13株についてPCR解析（実施例18）を行った。使用したプライマーは14番染色体断片についてはIgMおよびD14S543の2種（実施例68）、2番染色体断片についてはV $\kappa$ 1およびFABP1の2種（実施例12）である。その結果、8株において4種全てのマーカーの存在が確認された。そのうちKH13株についてはヒト染色体特異的プローブを用いてFISH解析を行った（実施例9、12）。その結果を図34に示す。KH13においてはプローブにハイブリダイズする独立した染色体小断片が2本観察された。これらの結果より、KH13は14番染色体断片および2番染色体断片を同時に保持することが示された。

（実施例63）ヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞へのヒト22番染色体（軽鎖 $\lambda$ 遺伝子を含む）の導入

実施例61-（1）で得られた、内在性抗体重鎖及び $\kappa$ 鎖欠損かつヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）を保持するマウスES細胞株HKD31-8に（実施例35）で示した通りにピューロマイシン耐性遺伝子でマーキングされたヒト22番染色体（抗体軽鎖 $\lambda$ 遺伝子を含む）をマイクロセル法により導入した。その結果得られたピューロマイシン、G418二重耐性株12株についてPCR解析（実施例35）を行った。使用したプライマーは14番染色体断片についてはIgMおよびD14S543の2種、22番染色体断片についてはIg $\lambda$ 、D22S315、D22S275、D22S278、D22S272、D22S274の6種（実施例2）である。その結果、10株において8種全てのマーカー

一の存在が確認された。残り2株のうちLH13株においては8種中IgM, D14S543, Ig1, D22S275, D22S274の5種のマーカーのみが確認されたので、この株は断片化されたヒト22番染色体を含むと考えられる。さらにLH13についてはヒト22番染色体特異的プローブおよびヒト14番染色体特異的プローブを各々用いてFISH解析を行った。その結果、それぞれのプローブにハイブリダイズする独立した染色体断片が観察された。すなわちこの株は14番染色体断片および22番染色体断片を同時に保持することが示された。

（実施例64）ヒト2番（抗体軽鎖 $\kappa$ ）、14番（抗体重鎖）、22番（抗体 $\lambda$ 鎖）染色体あるいはその部分断片を同時に保持する内在性抗体重鎖、軽鎖欠損マウスES細胞の取得

3種のヒト染色体を同時に保持するマウスES細胞を得るために、ヒト2番あるいは22番染色体をブラストサイジン耐性（Izumiら、Exp. Cell. Res., 197, 229, 1991）、ハイグロマイシン耐性（Windら、Cell, 82, 321-, 1995）等のマーカー遺伝子の挿入によりマーキングする。これは（実施例16、26）に示した方法により行う。（実施例62）で得られた、内在性抗体重鎖及び軽鎖欠損でありかつヒト14番染色体（断片）及び2番染色体部分断片を保持するマウスES細胞株（TT2F由来、G418耐性、ピューロマイシン耐性）に（実施例9）で示した方法と同様にブラストサイジン耐性あるいはハイグロマイシン耐性等でマーキングされたヒト22番染色体（ヒト抗体軽鎖 $\lambda$ 遺伝子を含む）を導入する。ES細胞培養用のフィーダー細胞はそれぞれの選択マーカーに適したものを使用する。ハイグロマイシン耐性マーカーを使用する場合は、そのマーカーを保持し、発現するトランスジェニックマウス系統より得た初代培養繊維芽細胞（Johnsonら、Nucleic Acids Research, vol. 23, No. 7, 1273-, 1995）を使用する。得られるG418、ピューロマイシン、ハイグロマイシン（あるいはブラストサイジン）三重耐性株は上記3種のヒト染色体（断片）を保持していることがPCR解析等（実施例9、18、3

5）により確認される。（実施例63）で得られた内在性抗体重鎖及び軽鎖欠損でありかつヒト14番染色体（断片）及び22番染色体（断片）を保持するマウスES細胞株（TT2F由来、G418耐性、ピューロマイシン耐性）へのハイグロマイシンある



いはブラストサイジン耐性遺伝子でマーキングされたヒト2番染色体断片の導入も同様に行う。

（実施例65）ヒト抗体重鎖および軽鎖遺伝子をそれぞれ含む複数の染色体（断片）を同時に保持する内在性抗体重鎖、軽鎖遺伝子欠損マウスES細胞からのキメラマウス作成

（実施例61、62、63、64）で取得されるヒト抗体遺伝子を含む染色体（断片）を保持する内在性抗体重鎖、軽鎖遺伝子欠損マウスES細胞株からのキメラマウス作成は（実施例10）等で示した方法により行う。ここで得られるキメラマウスにおいては、宿主胚由来のB細胞で産生されるマウス抗体とES細胞株由来のB細胞で主に産生されるヒト抗体が（実施例14、23、32）で示した方法により検出される。また、このES細胞由来のB細胞において機能的な抗体重鎖及び軽鎖 $\kappa$ 遺伝子は導入染色体上のヒト由来のもののみであるので、ES細胞由来のB細胞の多くはヒト抗体重鎖及び軽鎖 $\kappa$ を産生する（Lonbergら, Nature, 368, 856-, 1994）。さらに、（実施例37、38）で示した方法により重鎖、軽鎖が共にヒト由来である完全なヒト抗体分子が検出される。

（1）ヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）及びヒト2番染色体断片（軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む）を同時に保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞からのキメラマウス作成

実施例62で取得されたヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）及びヒト2番染色体断片（軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む）を同時に保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞株KH13からのキメラマウス作成は（実施例10）等で示した方法により行った。計176個の注入胚を移植した結果、20匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚（ICR）由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかにより判定される。誕生した20匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は7匹であった。

この結果より、ヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）及びヒト2番染色体断片（軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む）を同時に保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子

欠損マウスES細胞株はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

(2) ヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）及びヒト22番染色体断片（軽鎖 $\lambda$ 鎖遺伝子を含む）を同時に保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞からのキメラマウス作成

実施例63で取得されたヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）及びヒト22番染色体断片（軽鎖 $\lambda$ 鎖遺伝子を含む）を同時に保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞株LH13からのキメラマウス作成は（実施例10）等で示した方法により行った。計114個の注入胚を移植した結果、22匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚（ICR）由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかにより判定される。誕生した22匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は5匹であった。

この結果より、ヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）及びヒト22番染色体断片（軽鎖 $\lambda$ 鎖遺伝子を含む）を同時に保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞株はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

(3) ヒト2番染色体部分断片及びヒト14番染色体部分断片を同時に保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウス血清における完全ヒト抗体の検出・定量

実施例65-(1) で作製したキメラマウス（KH13由来）から生後40日目に採血し、血清中のヒト抗体濃度を（実施例14）に従いELISA法で検出した。PBSで希釈した抗ヒト免疫グロブリン $\kappa$ 鎖抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.、01-10-10）あるいは抗ヒト免疫グロブリン $\kappa$ 鎖抗体（Vector、AI-3060）をコーティングし、マウス血清（シグマ、M5905）を加えたPBSで希釈した血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\mu$ 鎖抗体（The Binding Site Limited、MP008）あるいはペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖抗体（シグマ、A0170）を加えてインキュベートした。ペルオキシダーゼ基質としてTMBZ（住友ベークライト、ML-1120T）の添加により酵素活性を450nmの

吸光度で評価し、精製された $\mu$ 鎖と $\kappa$ 鎖を持つ濃度既知のヒトイムノグロブリンIgM (Caltag、13000)、IgG (シグマ、14506) をマウス血清を添加したPBSで段階的に希釈したものと比較し血清中のヒト抗体濃度を求めた。結果を表21に示す。完全ヒト抗体濃度が内在性遺伝子を破壊しないES細胞から作製されたキメラマウスに比べて、10倍以上高いキメラマウス個体が確認された。またヒト $\gamma$ 鎖を含む完全抗体がキメラマウス血清中に確認された。

この結果よりヒト14番染色体部分断片及びヒト22番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウスにおいて、重鎖と軽鎖がともにヒトである完全ヒト抗体濃度が上昇することが確認された。

表21 キメラマウス中のヒト抗体濃度(ELISA)

ESクローン	キメラマウス	キメラ率%	IgM, $\kappa$ (mg/l)	IgG, $\kappa$ (mg/l)
KH13	CKH13-1	95	0.1	0.07
KH13	CKH13-2	85	0.9	0.13

(4) ヒト14番染色体部分断片及びヒト22番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウス血清における完全ヒト抗体の検出・定量

実施例65-(2)で作製したキメラマウス(LH13由来)から生後49日目に採血し、血清中のヒト抗体濃度を(実施例14)に従いELISA法で検出した。PBSで希釈した抗ヒト免疫グロブリン $\lambda$ 鎖抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.、01-10-11)あるいは抗ヒト免疫グロブリン $\lambda$ 鎖抗体(Vector、AI-3070)をコーティングし、マウス血清(シグマ、M5905)を加えたPBSで希釈した血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\mu$ 鎖抗体(The Binding Site Limited、MP008)あるいはペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖抗体(シグマ、A0170)を加えてインキュベートした。ペルオキシダーゼ基質としてTMBZ(住友ベークライト、ML-1120T)の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価し、精製された $\mu$ 鎖と $\kappa$ 鎖を持つ濃度既知のヒトイムノグロブリンIgM (Caltag、13000)、IgG (シグマ、14506) をマウス血清を添加し

たPBSで段階的に希釈したものと比較し血清中のヒト抗体濃度を求めた。結果を表22に示す。完全ヒト抗体濃度が内在性遺伝子を破壊しないES細胞から作製されたキメラマウスに比べて、約40倍高いキメラマウス個体が確認された。またヒト $\gamma$ 鎖を含む完全抗体がキメラマウス血清中に確認された。

この結果よりヒト14番染色体部分断片及びヒト22番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウスにおいて、重鎖と軽鎖がともにヒトである完全ヒト抗体濃度が上昇することが確認された。

表22 キメラマウス中のヒト抗体濃度(ELISA)

ESクローン	キメラマウス	キメラ率%	IgM, $\lambda$ (mg/l)	IgG, $\lambda$ (mg/l)
LH13	CLH13-1	95	13	2.6
LH13	CLH13-2	90	2.8	0.36

(実施例66) ヒト14番染色体部分断片及びヒト22番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、軽鎖欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に移入して作製したキメラマウスからの完全ヒト抗体産生ハイブリドーマの取得

(実施例67-(3)) で作製されたキメラマウスCLH13-3 (TT2FESクローンLH13由来、キメラ率35%) に対して、生後43日目からHSAによる免疫を開始した。PBSに溶解したヒト血清アルブミン (HSA、シグマ、A3782) とアジュバント (MPL+TDM Emulsion, RIBI Immunochem Research Inc.) とを混合して0.25mg/mlのHSA溶液を調整し、その0.2mlを1週間おきに2回腹腔に免疫した。さらに1週間後にPBSに溶解したヒト血清アルブミンを免疫した。1週間おきに採血し、血清中の抗HSAヒト抗体濃度を(実施例14) に従いELISA法で検出した。結果を図35に示す。最終免疫の3日後に、キメラマウスからひ臓を取り出し、(実施例24) に従いPEGにて細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。融合後の細胞を、ひ細胞数が100万個/mlとなるよう、HAT (大日本製薬、No. 16-808-49) あるいは1mg/mlのG418を添加した培地 (三光純薬、エス・クロンクローニングメデュームCM-B) に希釈し、96穴プレートの各wellに100 $\mu$ lずつ分注し培養した。どちらの選択培地にもHCF (エア・ブラウン) を5%添加した。G418、HAT選択のプレー

ト共に、培養6日目にはほぼ全wellにコロニーが生じ、合計約770個のハイブリドーマ陽性ウエルを得た。培養上清を採取し、(実施例14)に従いELISA法によってヒト抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。抗ヒト免疫グロブリン $\lambda$ 鎖抗体(Vector、A1-3070)をコーティングし、ビオチン標識抗ヒト免疫グロブリン $\lambda$ 鎖抗体(Vector、BA-3070)さらにアビジン-ペルオキシダーゼ複合体(Vector、ABCキットPK4000)を用いてTMBZ(住友ベークライト、ML-1120 T)により検出した。陰性対照の約2倍以上の吸光度を目安にして判定し、17個の陽性ウエルを得た。陽性ウエルの細胞を24穴プレートに移し、IMDMに10%FBSを添加した培地を用いて培養した。培養上清を(実施例65-(4))の方法に従いELISAで解析し、16個のウエルで0.09~11mg/mlの、ヒトIg $\mu$ とIg $\lambda$ を持つ完全ヒト抗体の存在が確認された。(実施例33)に従い、抗HSAヒト $\lambda$ 鎖の抗体価を測定し、1個の陽性ウエルを得た。完全ヒト抗体陽性かつ抗HSAヒト $\lambda$ 鎖陽性ウエルの細胞をく安東、単クローン抗体実験操作入門、講談社サイエンティフィク、1991>に記された方法に従い、限界希釈法を用いてクローニングした。抗HSAヒト $\lambda$ 鎖陽性ハイブリドーマを2クローン得た。

この結果よりヒト14番染色体部分断片及びヒト22番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、軽鎖欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に移入して作製したキメラマウスから完全ヒト抗体を生産するハイブリドーマが得られることが確認された。またHSA抗原刺激に対して、抗原特異的ヒトIg $\mu$ およびIg $\lambda$ の抗体価上昇が起こることが確認された。さらにこのキメラマウスからヒトIg $\mu$ とIg $\lambda$ から成るHSA特異的抗体を生産するハイブリドーマが得られることが確認された。

また染色体が薬剤耐性マーカーを持つため、HATを添加せず、G418を用いてハイブリドーマを選択することが可能であった。このことによってヒト染色体を持つ細胞のみが増殖するため、ハイブリドーマを選択的に得ることができる。また融合後の細胞からヒト染色体の脱落を防ぐことが期待できる。さらに融合に用いるミエローマ細胞がHGPRT酵素(hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase)を持っているような、HAT選択に不向きな細胞であっても使用可能となることが期待される。

(実施例67) 重鎖遺伝子欠損宿主胚とのキメラマウス作成

(実施例49) で作成した内在性抗体重鎖片側アレル欠損TT2F細胞株由来キメラマウスの子孫のうち野性色を示すものについてサザン解析(実施例49)等により欠損アレルを保持する個体を選抜する(期待される確率は1/2である)。これらの抗体重鎖欠損ヘテロ接合体の雌雄個体の交配により生まれる子マウスについてサザン解析(実施例49参照)、血清中の抗体重鎖産生(Kitamuraら, Nature, 350, 423-, 1991)等の解析を行い、両側アレルが欠損し、自身の機能的な抗体をほとんど産生できない抗体重鎖欠損ホモ接合体を得ることができる(期待される確率は1/4である、膜型 $\mu$ 鎖欠損マウスにおける結果はKitamuraら, Nature, 350, 423-, 1991参照)。

(1) 抗体重鎖ノックアウトマウス系統の確立

(実施例49) で作成した内在性抗体重鎖片側アレル欠損TT2F細胞株由来キメラマウスの子孫のうち野性色を示すものについてサザン解析を行ない欠損アレルを保持する個体を選抜した。これらの抗体重鎖欠損ヘテロ接合体の雌雄個体の交配により生まれる子マウスについてサザン解析(実施例49参照)、血清中の抗体 $\mu$ 鎖産生(マウス $\mu$ 鎖のELISA解析は実施例75参照、Kitamuraら, Nature, 350, 423-, 1991)等の解析を行った結果、両側アレルが欠損し、自身の抗体をほとんど産生できない抗体重鎖欠損ホモ接合体を得ることができた(膜型 $\mu$ 鎖欠損マウスにおける結果はKitamuraら, Nature, 350, 423-, 1991参照)。

すなわち、抗体重鎖片側アレル欠損TT2F細胞株より、抗体重鎖ノックアウトマウス系統を確立することができた。

清浄な環境で飼育したホモ接合体雌雄個体の交配により得られる胚をキメラマウス作成の際の宿主として利用できる。この場合キメラマウスにおいて機能的なB細胞はほとんど注入したES細胞に由来する。RAG-2欠損マウス(Shinkaiら, Cell, 68, 855-, 1992)等、機能的なB細胞を自ら作ることができない他のマウス系統もこの目的に同様に利用できる。このシステムにおいて(実施例62、63、64)で得られる内在性抗体重鎖及び軽鎖欠損かつヒト14番+2番あるいは14番+22番あるいは14番+2番+22番染色体(断片)を保持するマウスES細胞株を使用し(実施例10)等にした方法でキメラマウスを作成する。得られるキメラマウス

スではES細胞由来のB細胞において機能的なヒト抗体重鎖（14番染色体上）、軽鎖 $\kappa$ （2番染色体上）、軽鎖 $\lambda$ （22番染色体上）遺伝子より主にヒト抗体を生産する。

（2）ヒト2番染色体部分断片及びヒト14番染色体部分断片を同時に保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に注入して作製したキメラマウス血清における完全ヒト抗体の検出・定量

（実施例62）で取得されたES細胞株KH10を実施例67-（1）で確立された抗体重鎖ノックアウトマウスの雌雄交配により得られる胚に注入することにより実施例65-（1）と同様な方法でキメラマウスを作製した。7週令のキメラマウスから採血し、血清中のヒト抗体濃度を（実施例14）（実施例65-（3））に従いELISA法で検出した。結果を表23に示す。ヒト $\kappa$ 鎖と $\mu$ 鎖または $\gamma$ 鎖を含む完全抗体がキメラマウス血清中に確認された。また免疫不全宿主胚にES細胞を移入することにより、B細胞はES細胞からのみ分化するため、たとえキメラ率が低くとも完全抗体が得られることが確認された。

表23 キメラマウス中のヒト抗体濃度(ELISA)

ESクローン	キメラマウス	キメラ率%	IgM, $\kappa$ (mg/l)	IgG, $\kappa$ (mg/l)
KH10	CKH10-1	6	6.1	0.17
KH10	CKH10-2	3	1.9	0.4

（3）ヒト14番染色体部分断片及びヒト22番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に注入して作製したキメラマウス血清における完全ヒト抗体の検出・定量

（実施例63）で取得されたES細胞株LH13を実施例67-（1）で確立された抗体重鎖ノックアウトマウスの雌雄交配により得られる胚に注入することによりキメラマウスを作製した（実施例65-（2）と同様な方法による）。誕生したキメラマウスから生後5週齢に採血し、血清中のヒト抗体濃度を（実施例14）（実施例65-（4））に従いELISA法で検出した。結果を表24に示す。ヒト $\lambda$ 鎖と $\mu$ 鎖または $\gamma$ 鎖を含む完全抗体がキメラマウス血清中に確認された。

表24 キメラマウス中のヒト抗体濃度(ELISA)

ESクローン	キメラマウス	キメラ率%	IgM, $\lambda$ (mg/l)
LH13	CLH13-3	35	51
LH13	CLH13-4	85	32
LH13	CLH13-4	30	27

(実施例68) ヒト14番染色体断片(抗体重鎖遺伝子を含む) 導入ES細胞由来キメラマウス子孫におけるヒト染色体の保持

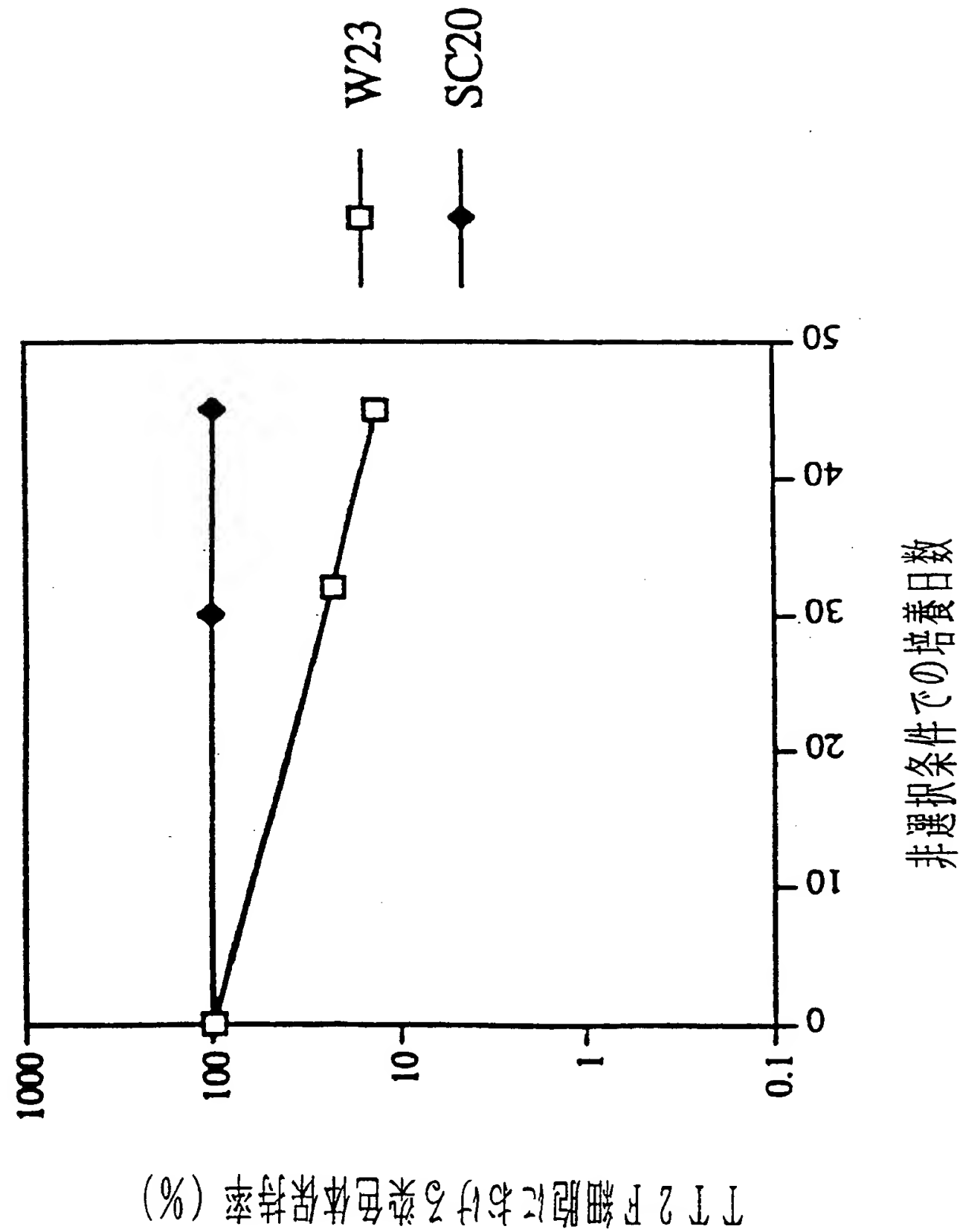
(1) 抗体重鎖遺伝子を含むヒト14番染色体断片を保持するヒトマウス雑種細胞の単離

ヒト2番染色体断片はマウスへの導入後、子孫への伝達が観察された(実施例42)ことから、ヒト14番染色体についても断片を用いることにより子孫への伝達の可能性が高まることが予想される。G418耐性遺伝子でマーキングされたインタクトなヒト14番染色体を保持するA9/#14株(実施例9; Tomizukaら, Nature Genet. vol 16, 133-143(1997)に記載されているA9/14-C11株)についてより詳細なFISH解析(実施例9)を行った結果、10%程度の細胞集団が非常に小さく断片化したヒト14番染色体のみを含むことが観察された。この染色体断片は2番染色体断片(実施例12)と同程度のサイズであり、またG418耐性マーカを含むと考えられる。

断片化ヒト14番染色体を含む細胞クローンの単離のため、A9/#14細胞約300個を10cmシャーレに播種して培養し、10日後に出現したコロニーを31個ピックアップした。これらのクローンよりゲノミックDNAを調製し、(実施例9)と同様な方法で14番染色体特異的プライマー(実施例9に示された18種のうちPCI、NPを除く16種)を用いたPCR解析を行った。その結果、1株(A9/SC20)において16種中IgM、IGG1、IGA2、IGVH3のみが検出された。また、ヒト14番染色体長腕部テロメア近傍のマーカであるD14S543(Science, HUMAN GENETIC MAP (1994),塩基配列はGenbank等のデータベースより入手)も検出されたことから、この断片(以後SC20断片)は抗体重鎖遺伝子を含む14番染色体テロメア近傍部を含むと



図 38





	腦		脾臓		肝臓		骨髓		精巢					
	+	-	+	-	+	-	+	-	第1減		第2減		精子	
									+	-	+	-	+	-
16-5 (F1)	30 (100%)	0	11 (21%)	42	30 (97%)	1	1 (3%)	30	15 (100%)	0	15 (94%)	1	11 (32%)	23
17-8 (F1)	30 (100%)	0	12 (30%)	28	30 (100%)	0	21 (43%)	28	16 (100%)	0	9 (53%)	7	14 (34%)	27
17-23 (F1)	41 (95%)	2	7 (17%)	34	31 (97%)	1	5 (17%)	25	15 (100%)	0	13 (81%)	3	13 (52%)	12

図 39 マウス個体におけるSC20断片の保持



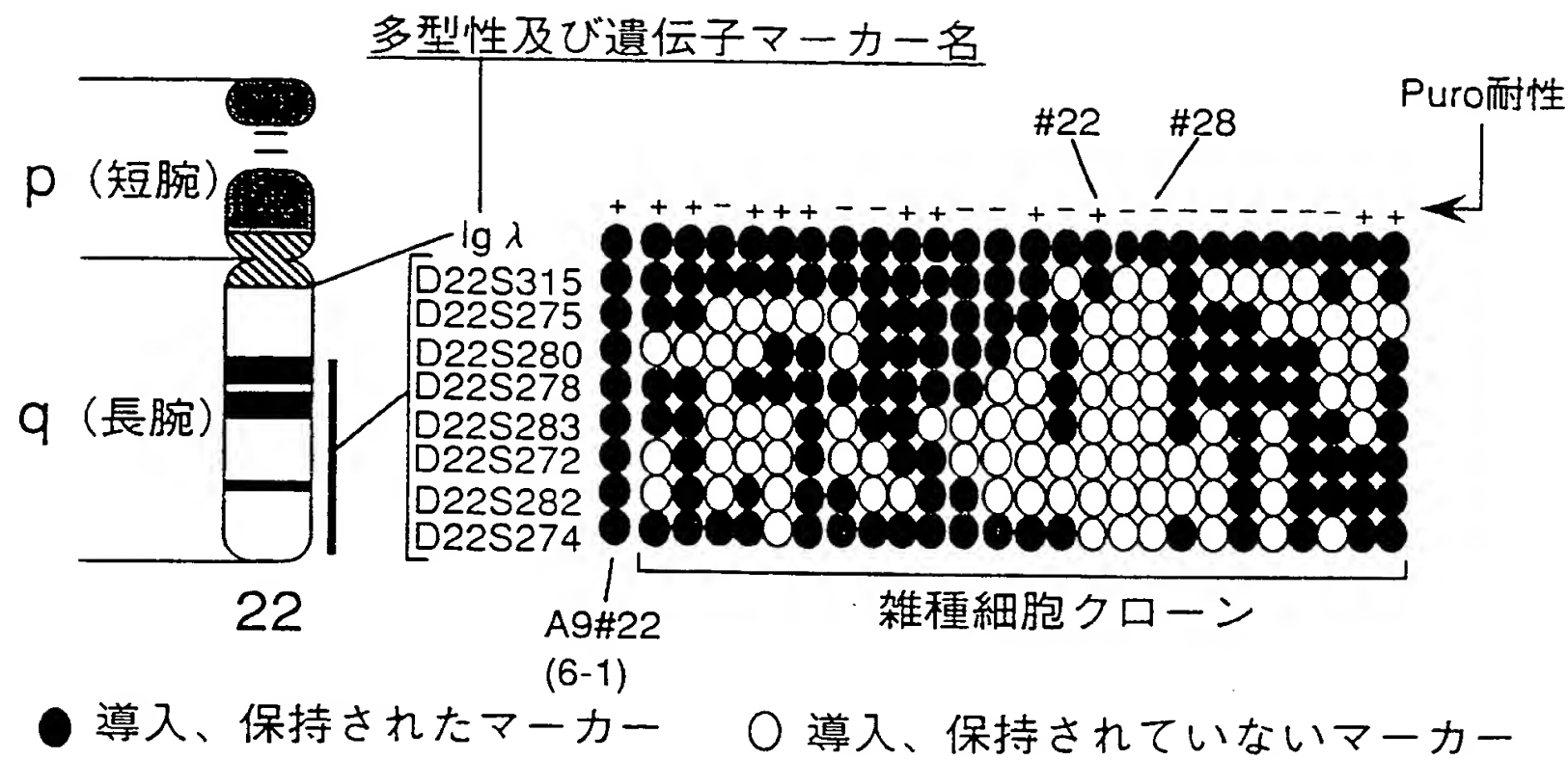


図 40

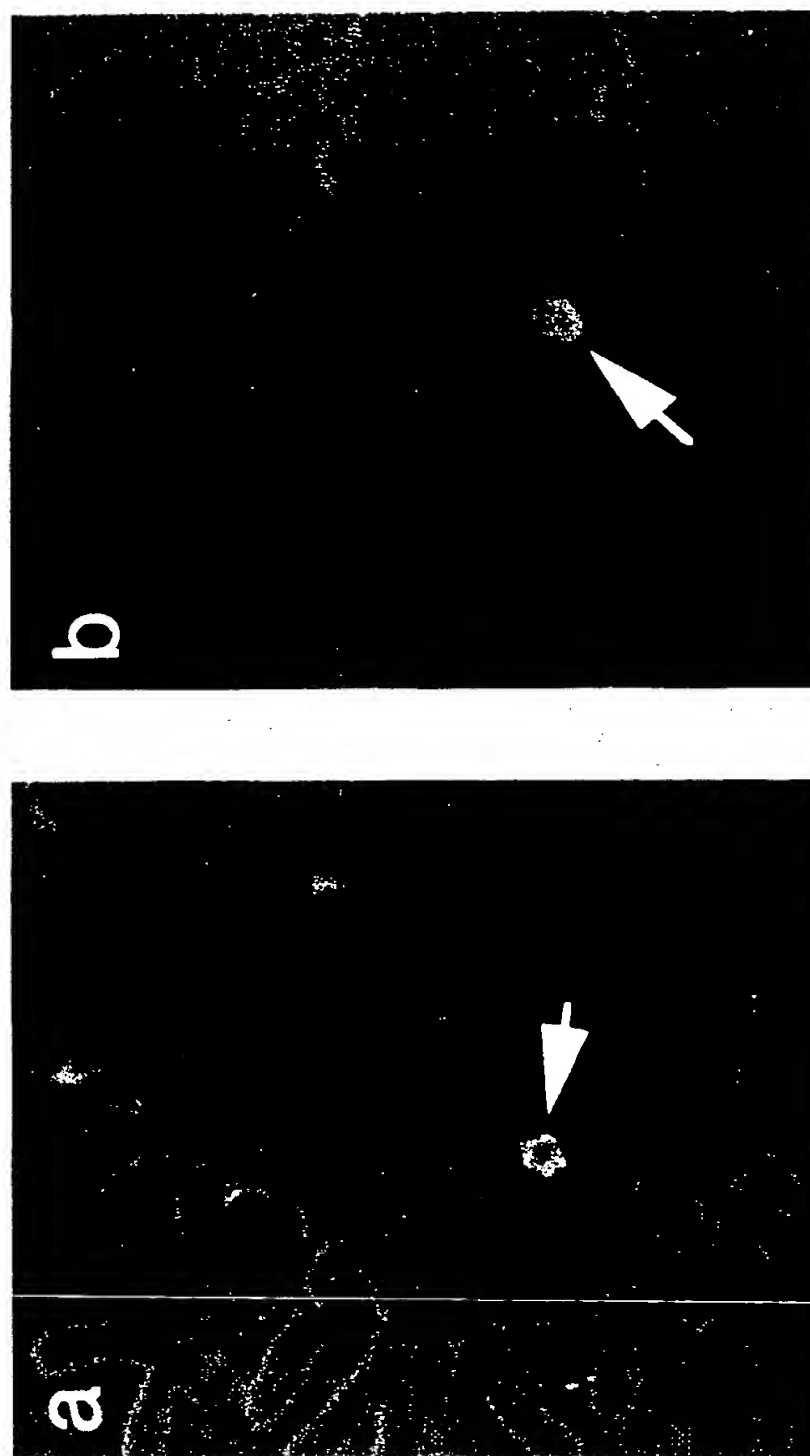


1

2

3

4



a) クロージン #28 b) コントロール

図 41





	HK23	HK28	HK29
抗体重鎖ノックアウト	ホモ	野生型 or ヘテロ	野生型 or ヘテロ
抗体軽鎖ノックアウト	ヘテロ	野生型	ヘテロ
W23断片	+	+	+
SC20断片	+	+	+
血清中ヒト $\mu$ 鎖 (mg/l)	100	5.9	14
血清中ヒト $\kappa$ 鎖 (mg/l)	8.6	8.4	25
血清中ヒト $\mu/\kappa$ 鎖 (mg/l)	18	0.13	検出限界以下

\*抗体重鎖ノックアウトはマウス $\mu$ 鎖発現の有無で判定しているのでヘテロと野生型の区別は不能

\*抗体軽鎖ノックアウトはサザン解析にて判定

図 42



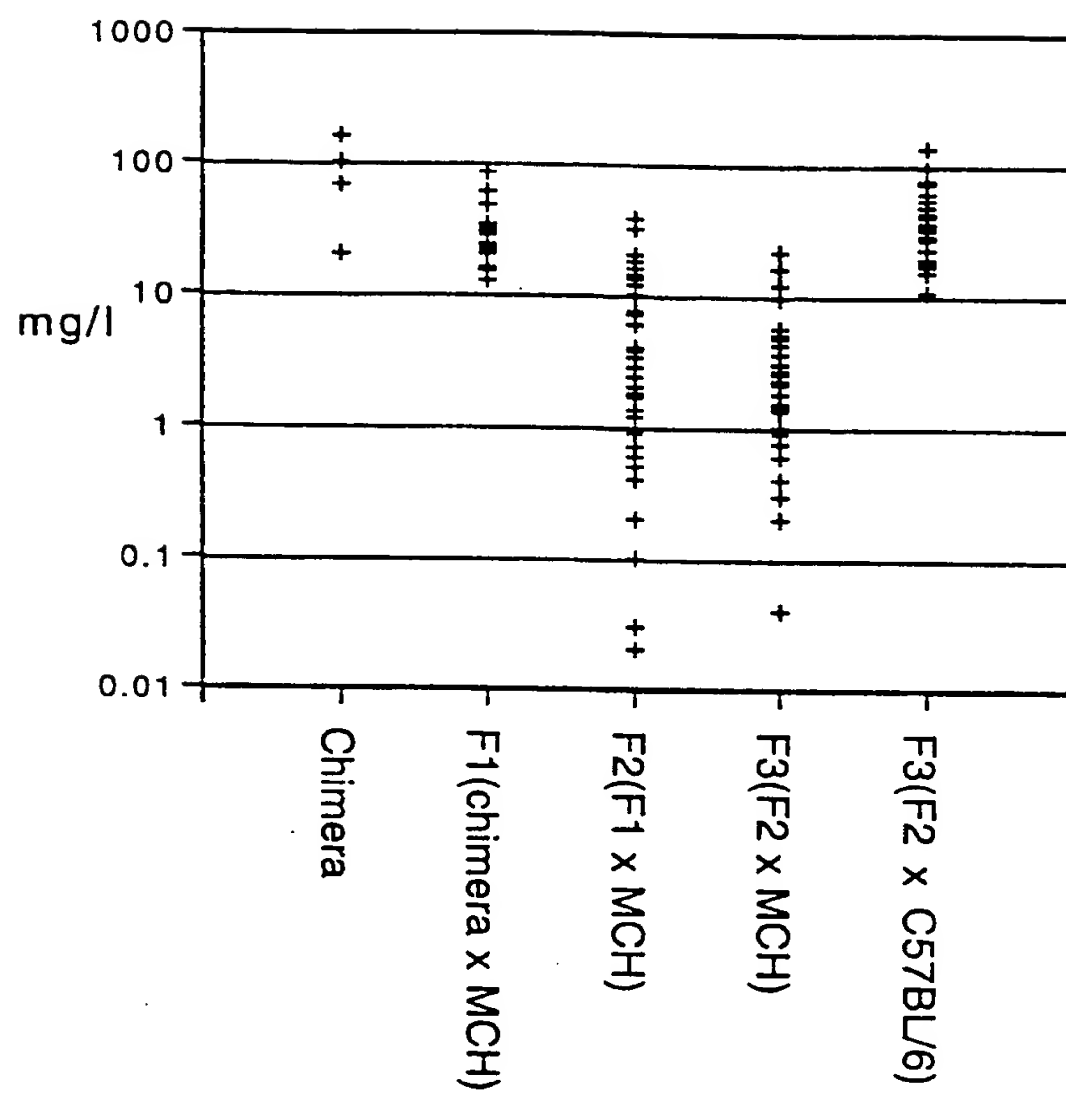
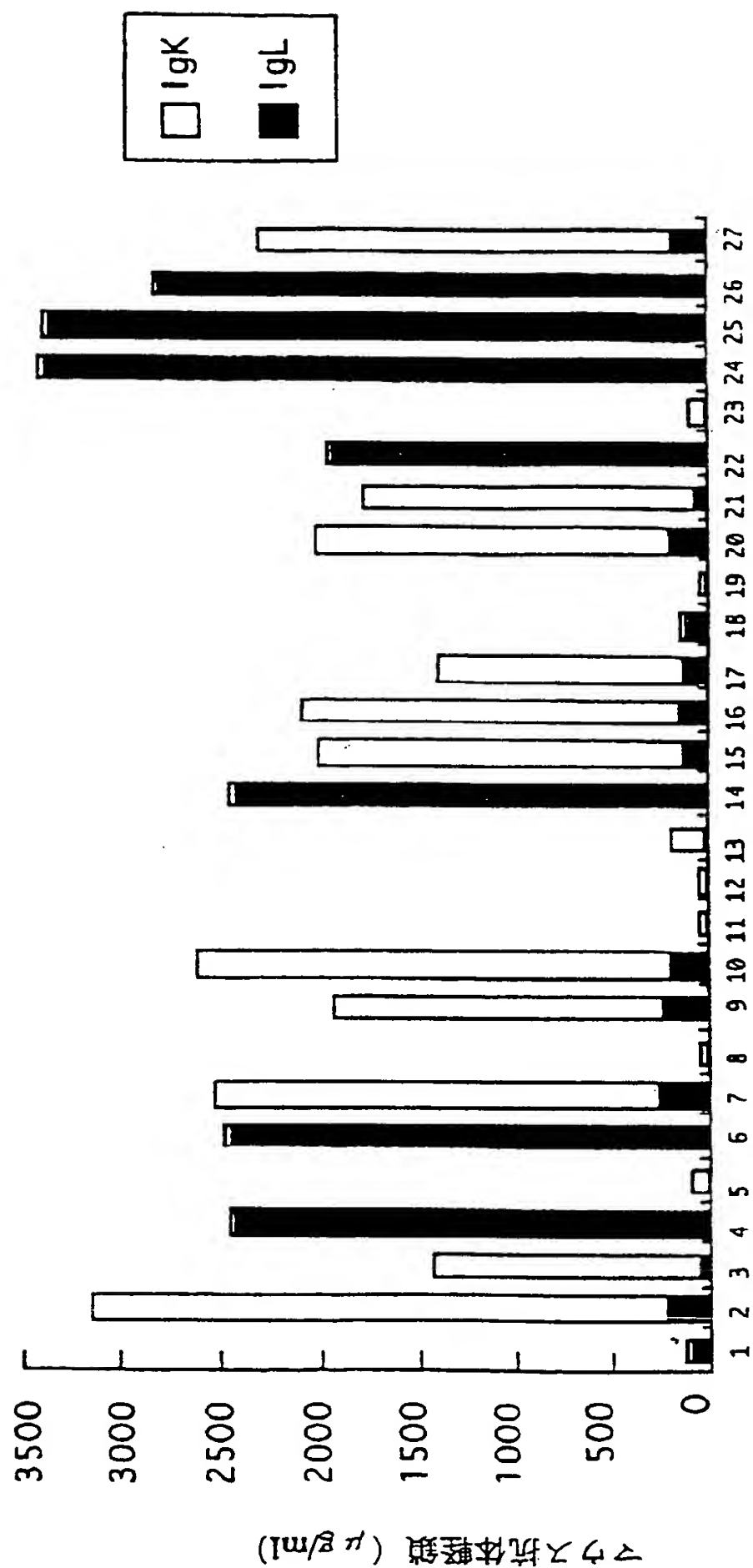


図 43



図 44





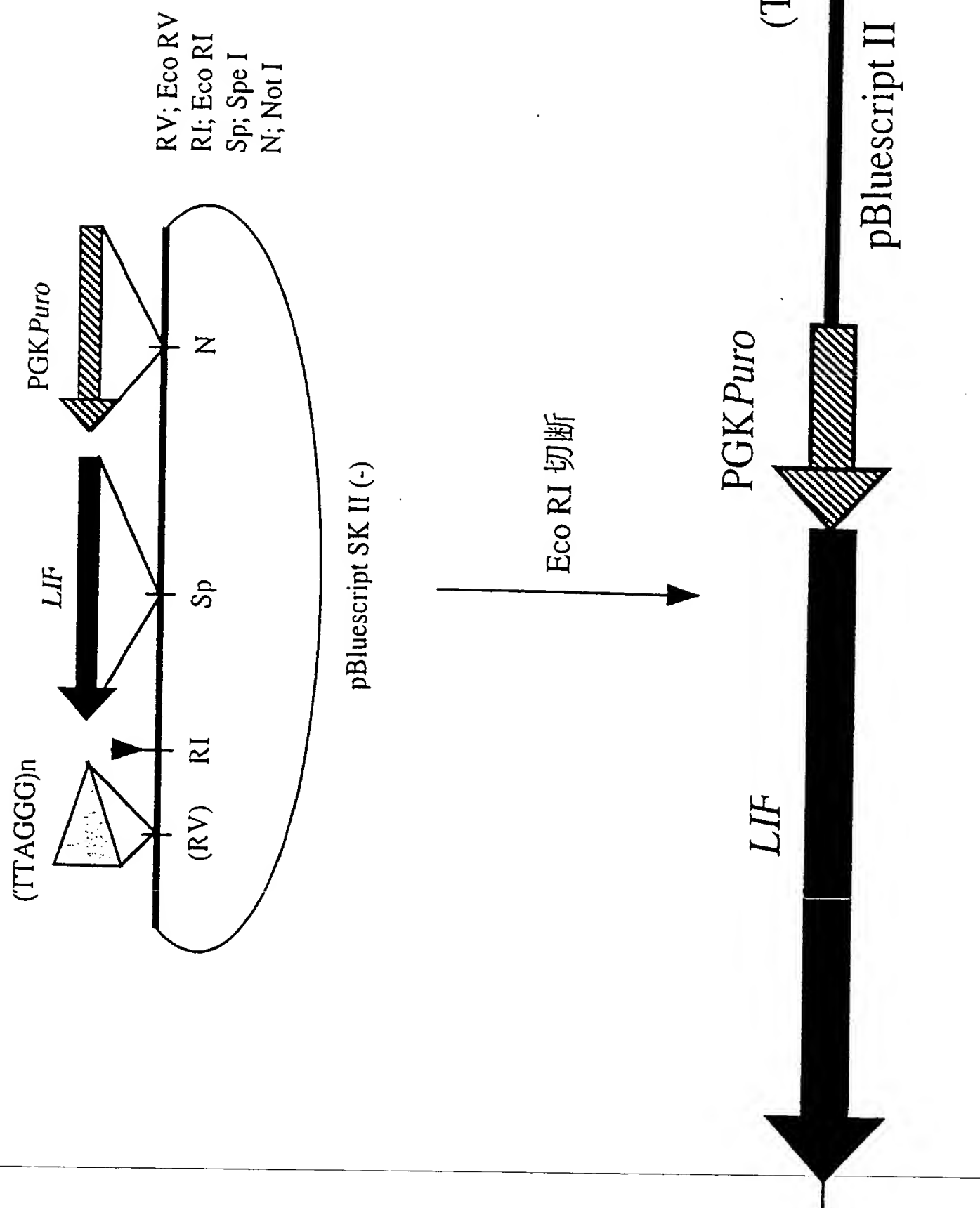


図 45





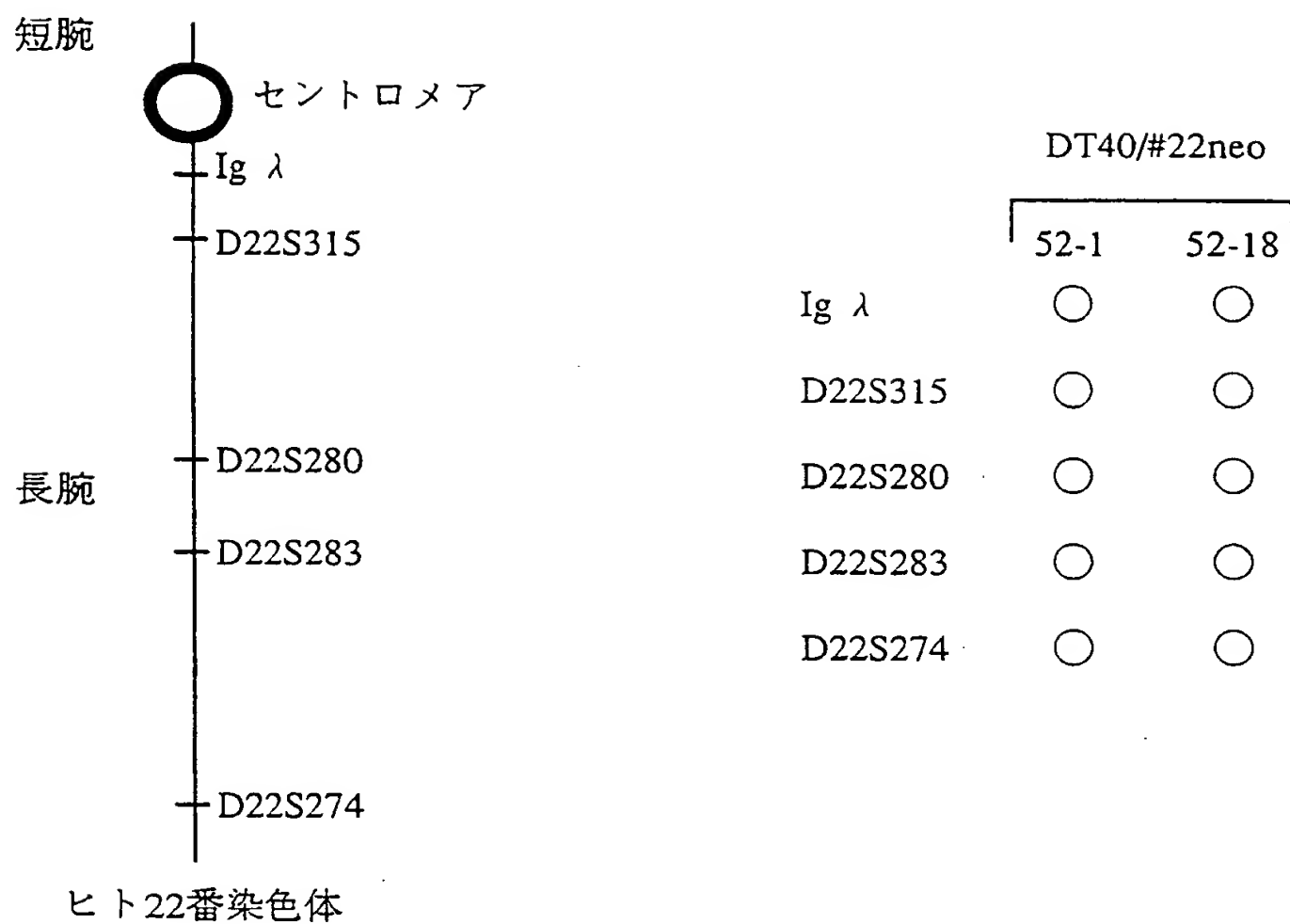


図 46



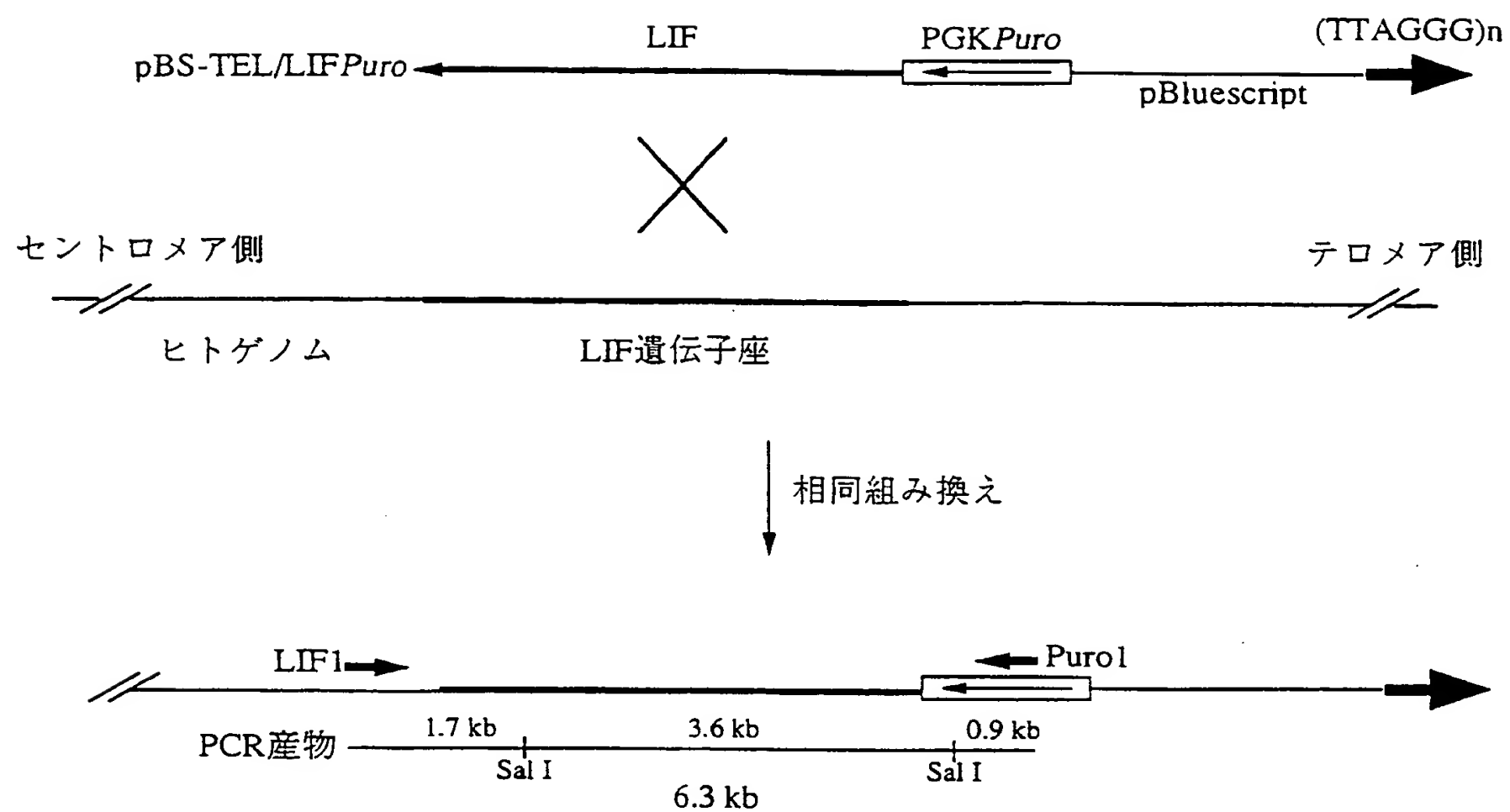


図 47



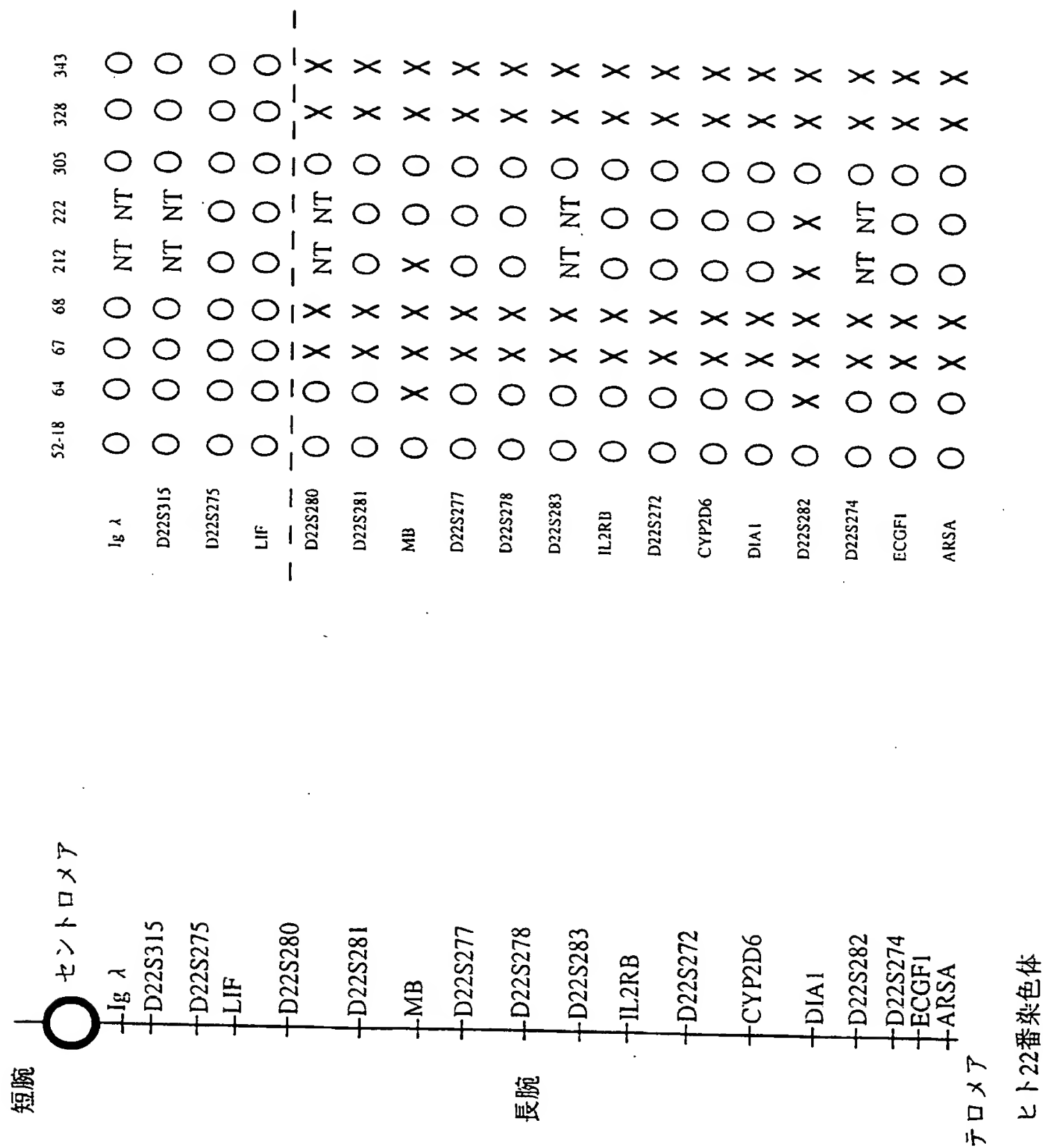
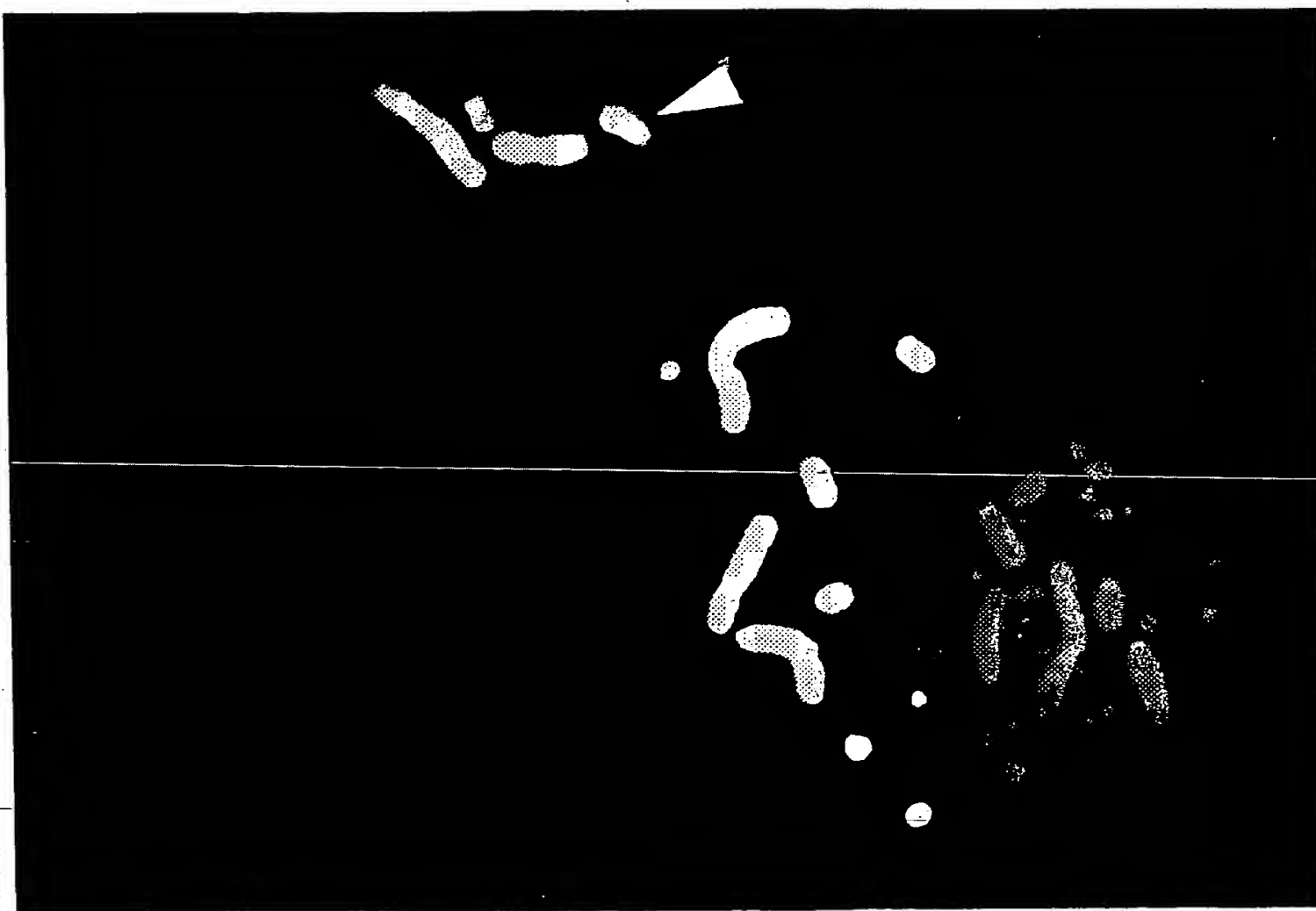
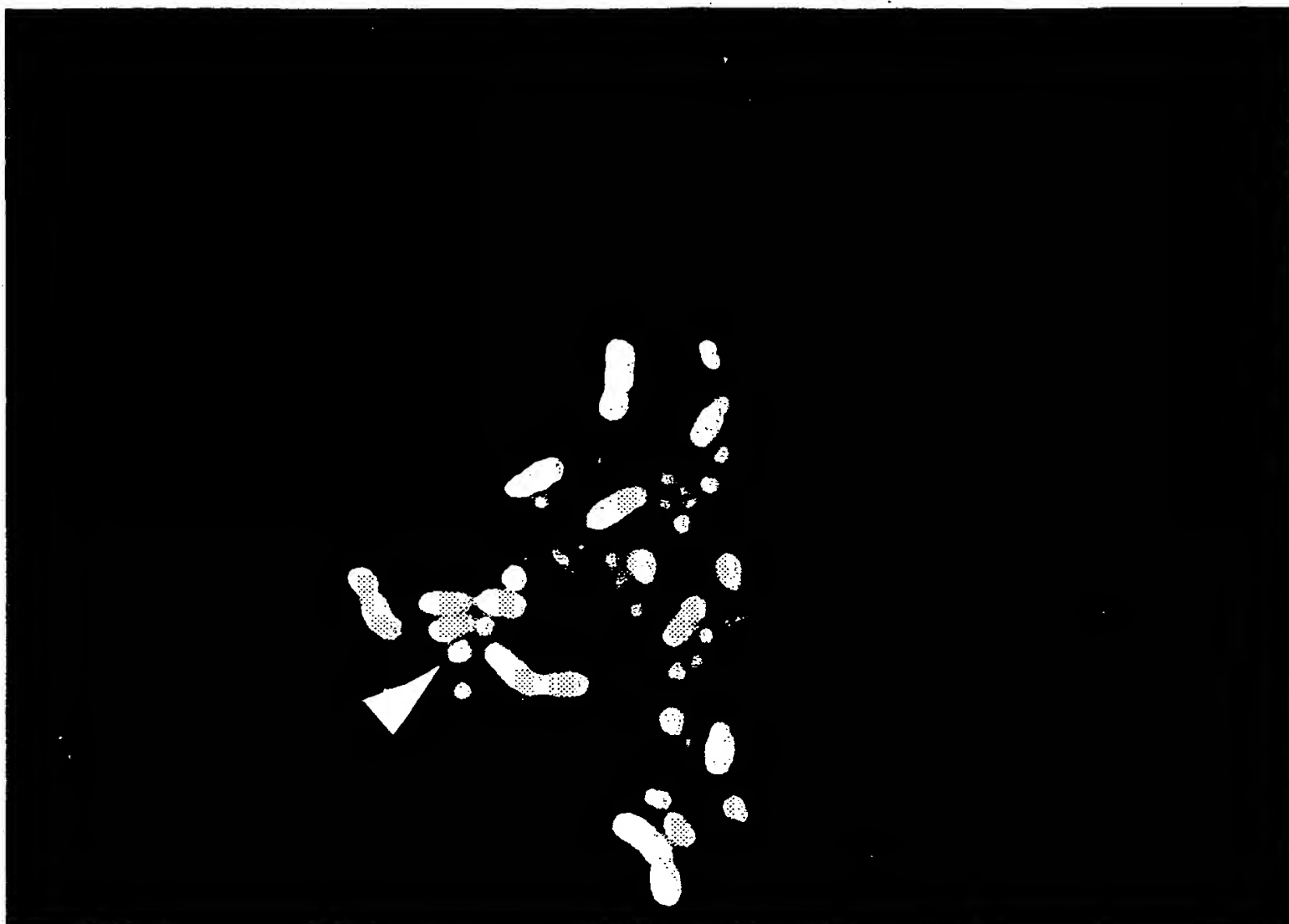


図 48









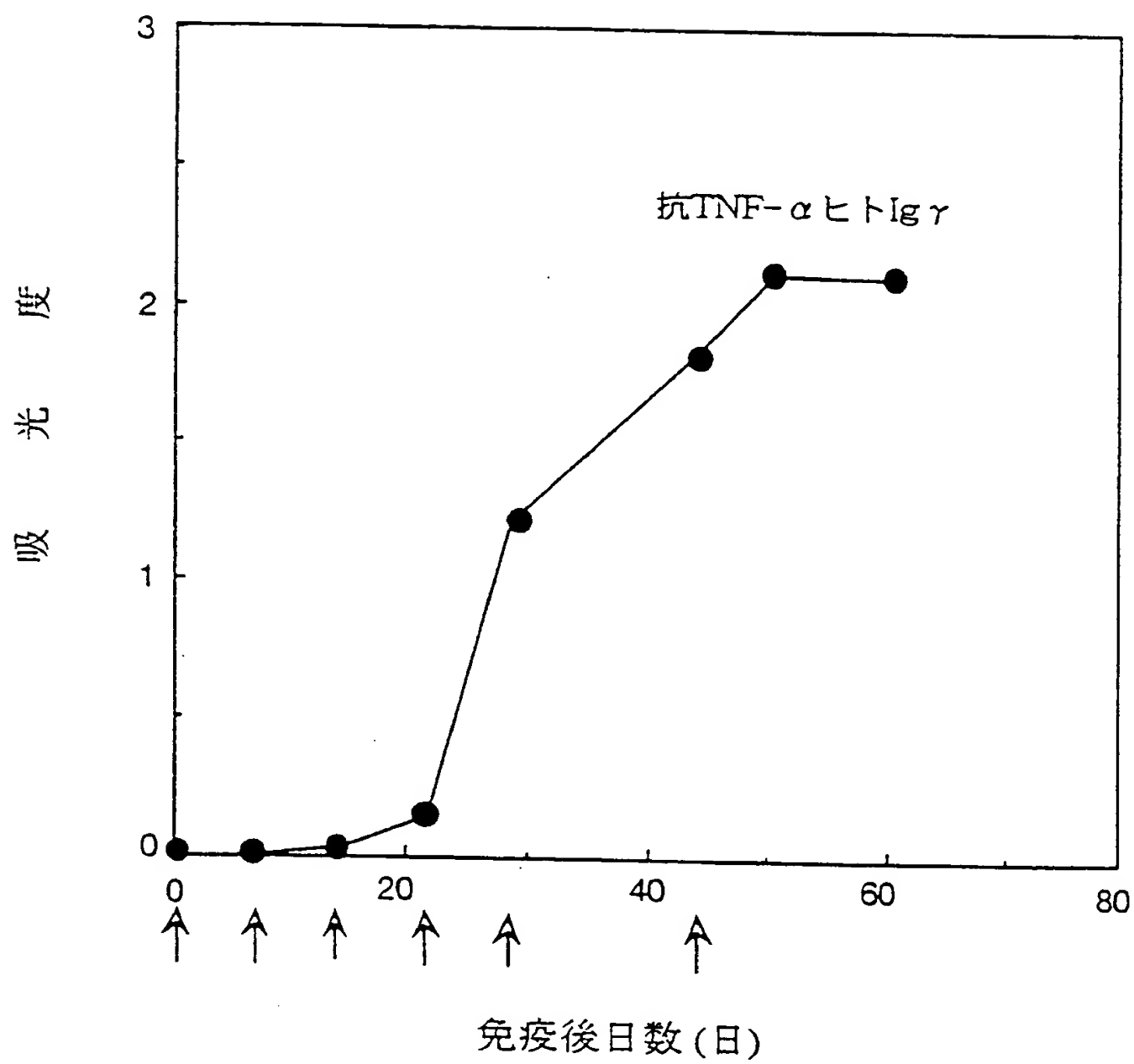


図 50



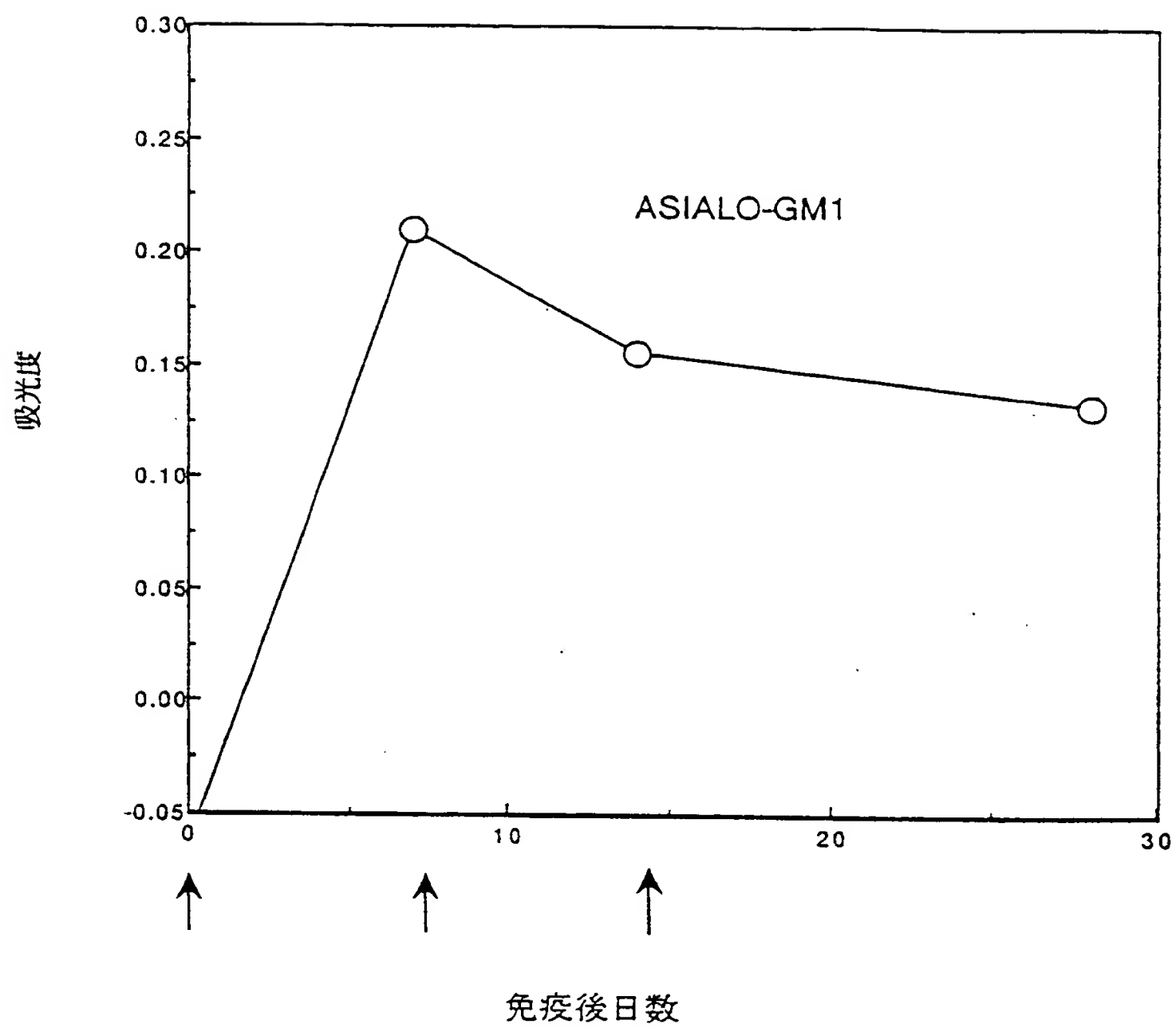


図 51



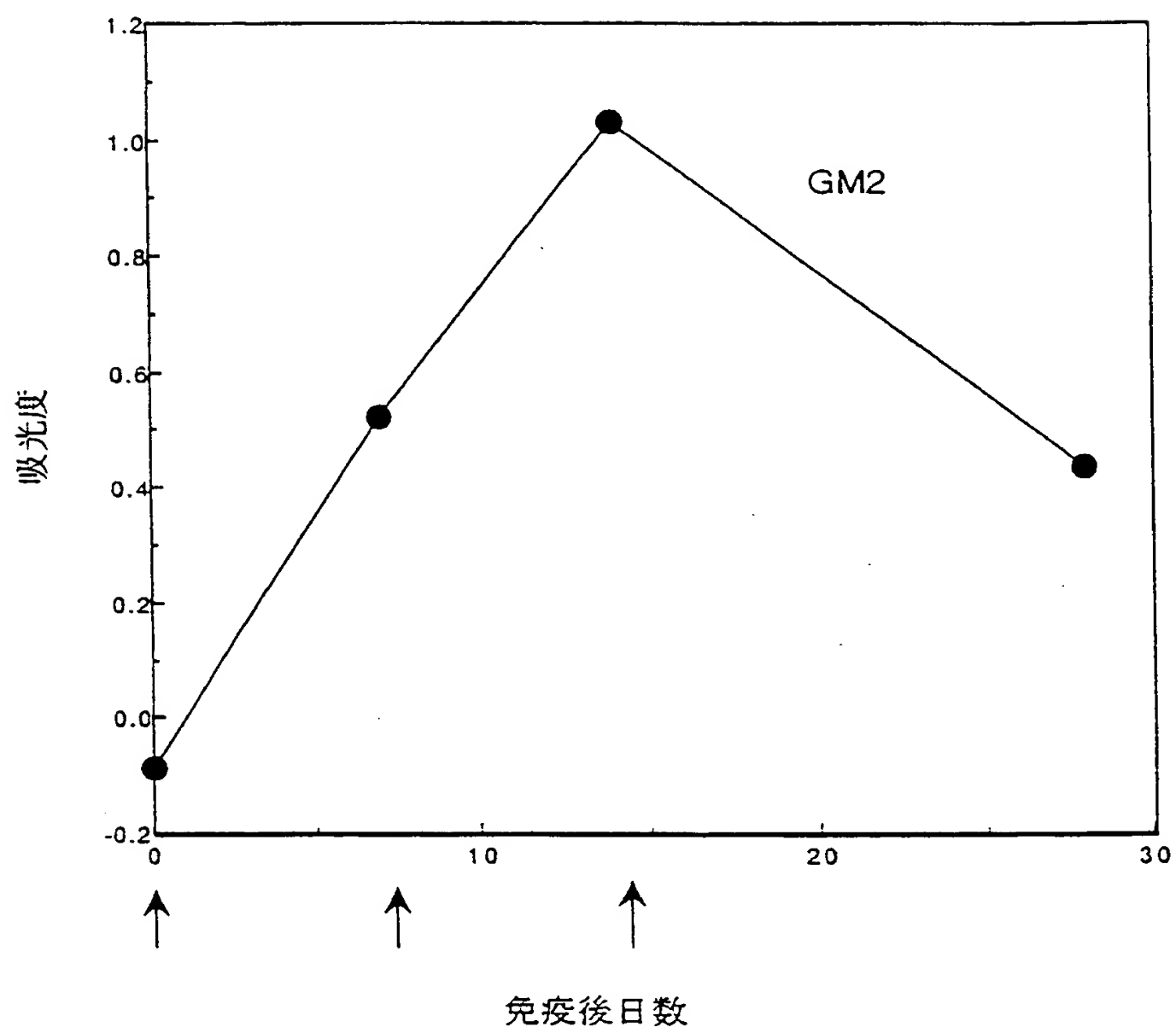
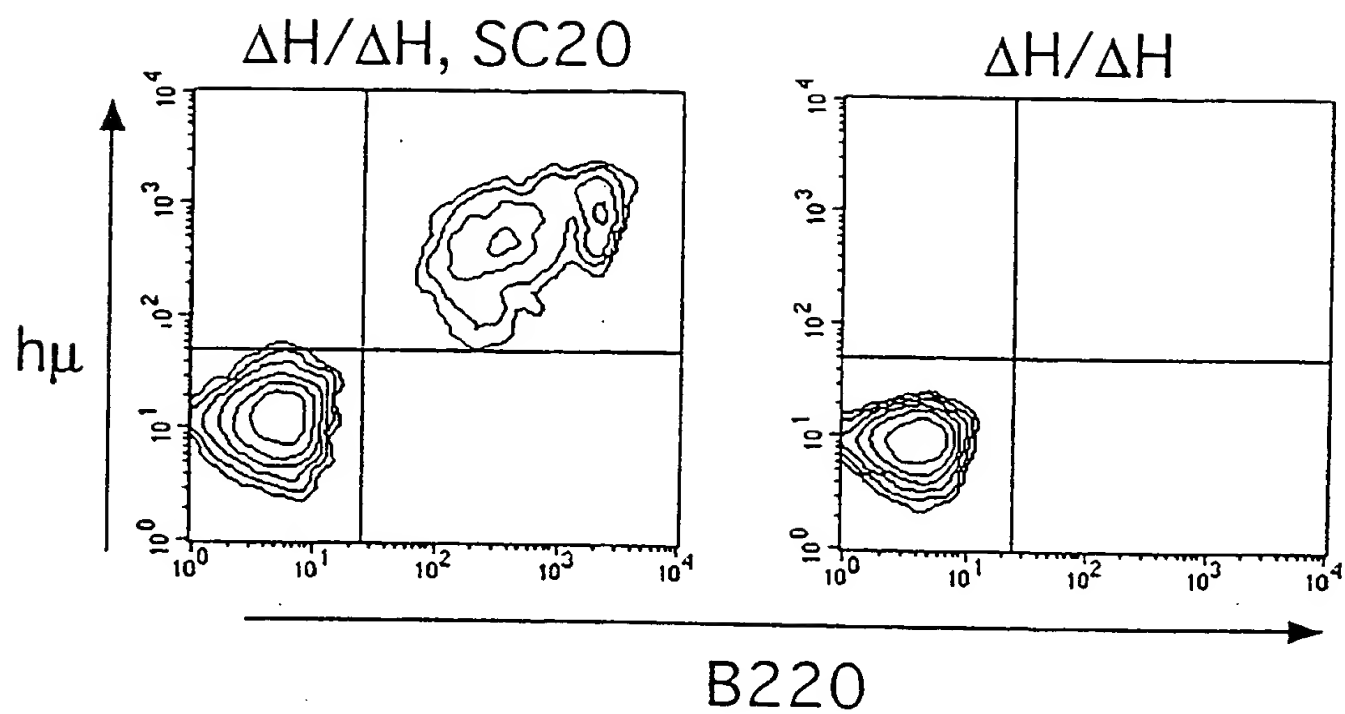


図 52





$\Delta H/\Delta H, SC20$ : シングルTc/KOマウス  
 $\Delta H/\Delta H$ : 抗体重鎖KOマウス

図 53





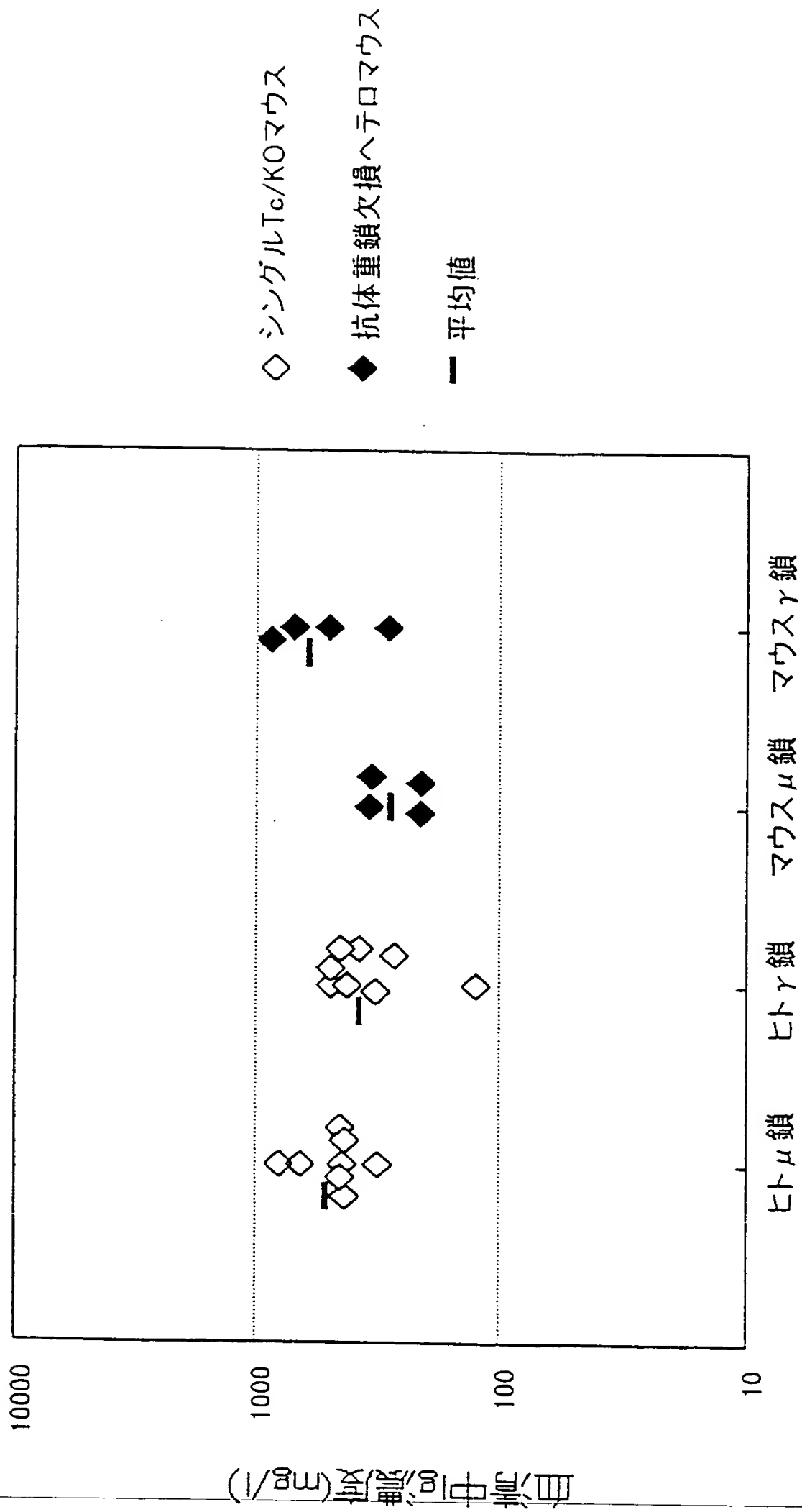
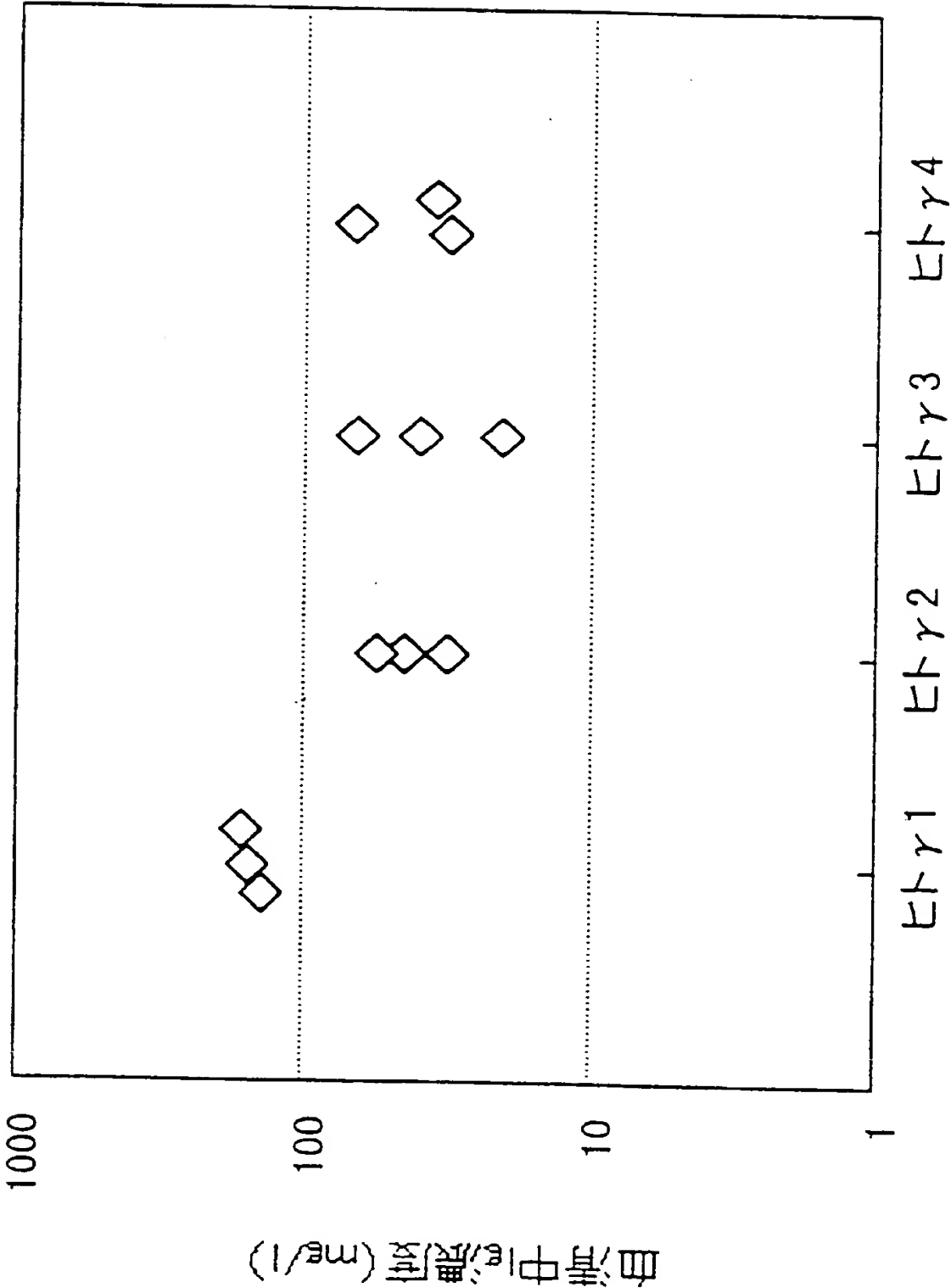


図 54







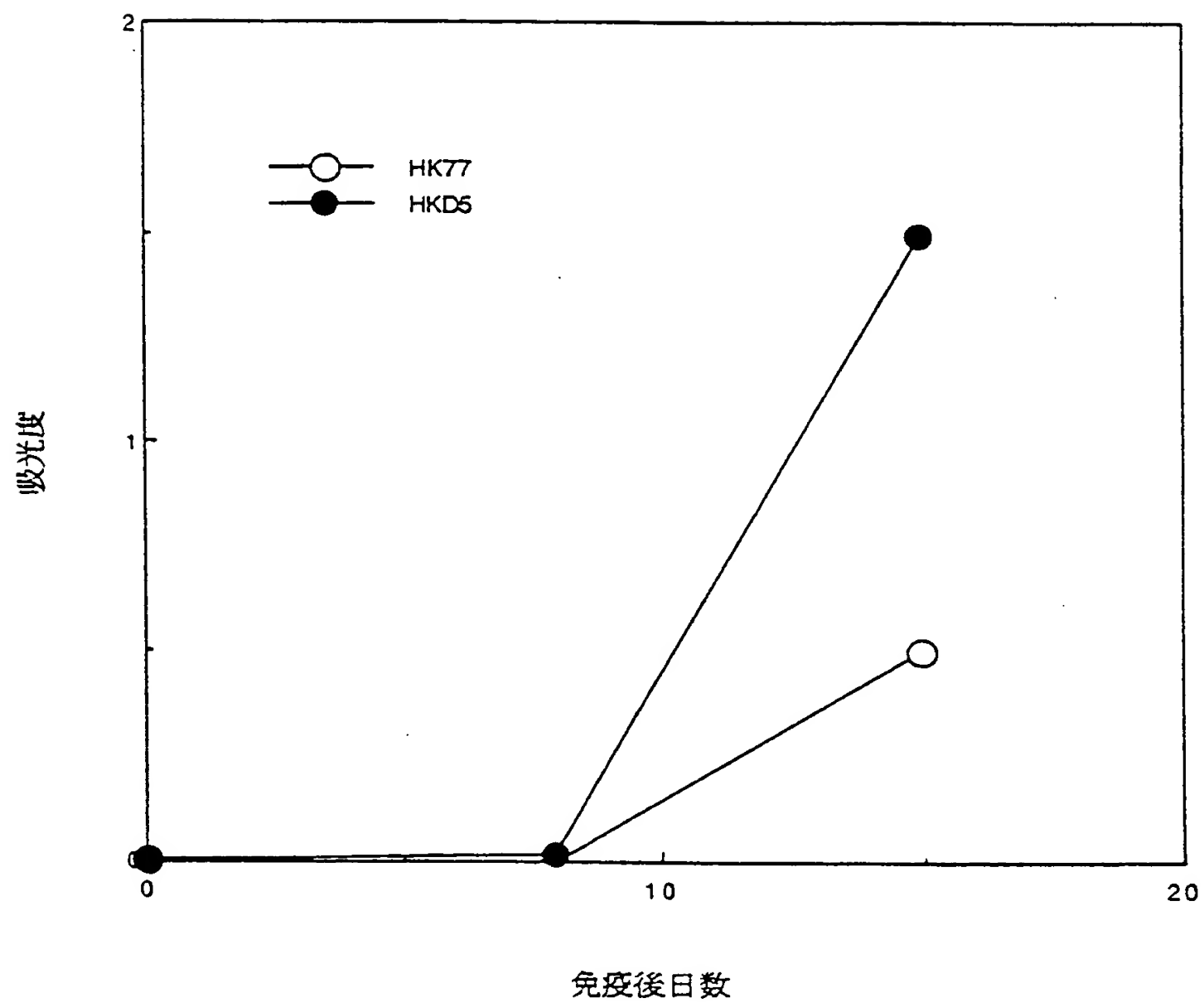


図 56



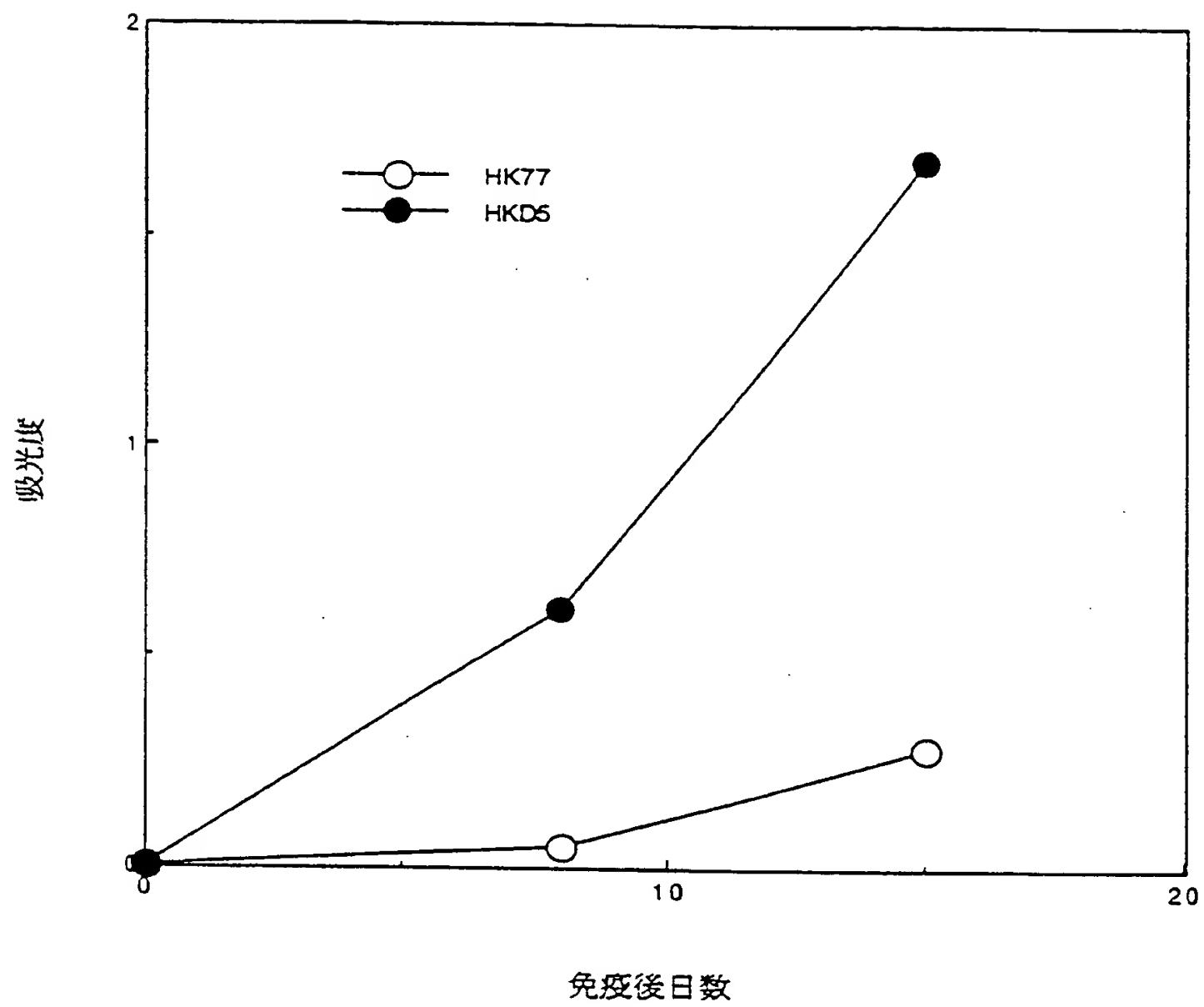


図 57





85

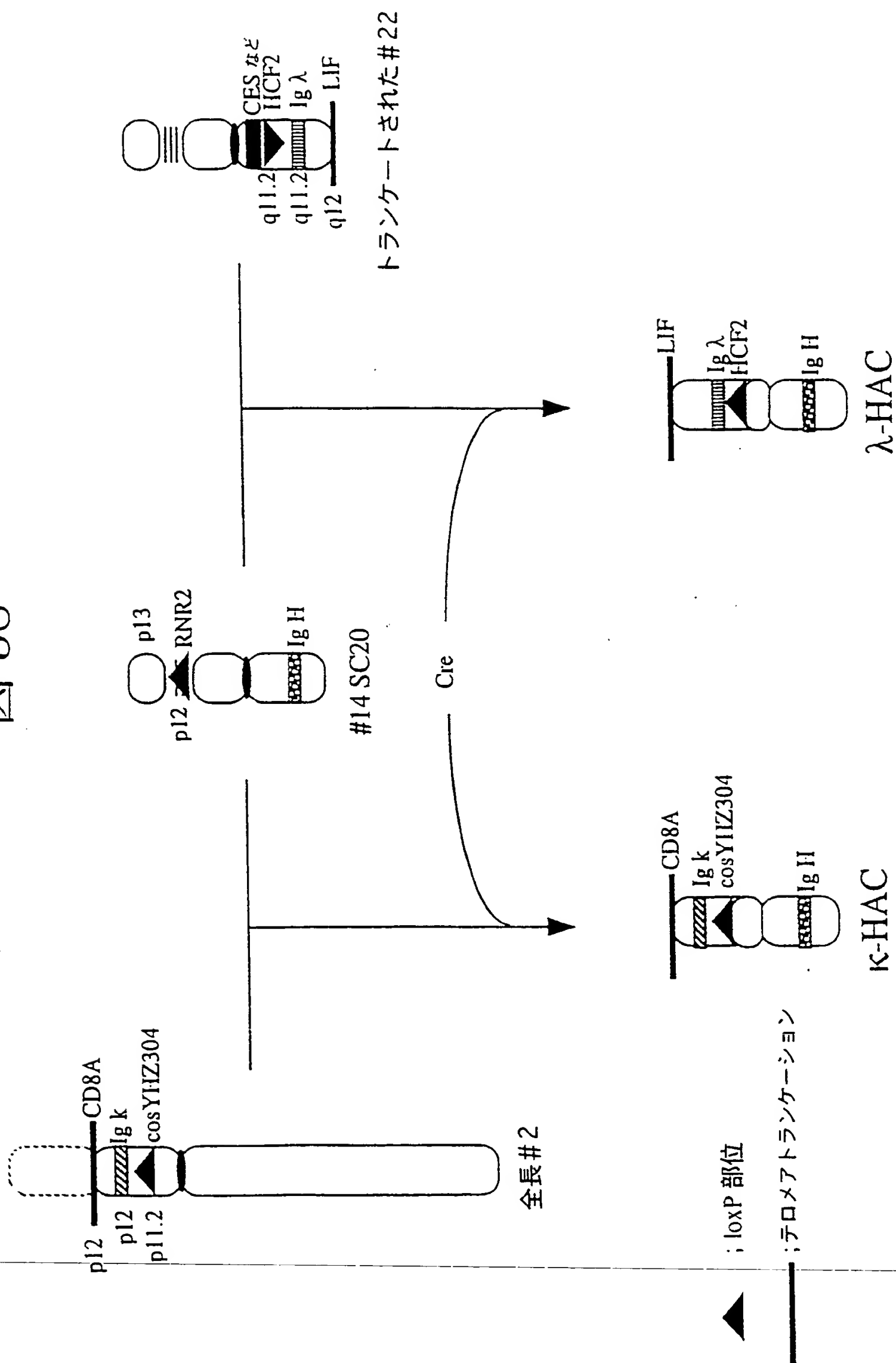




図 59

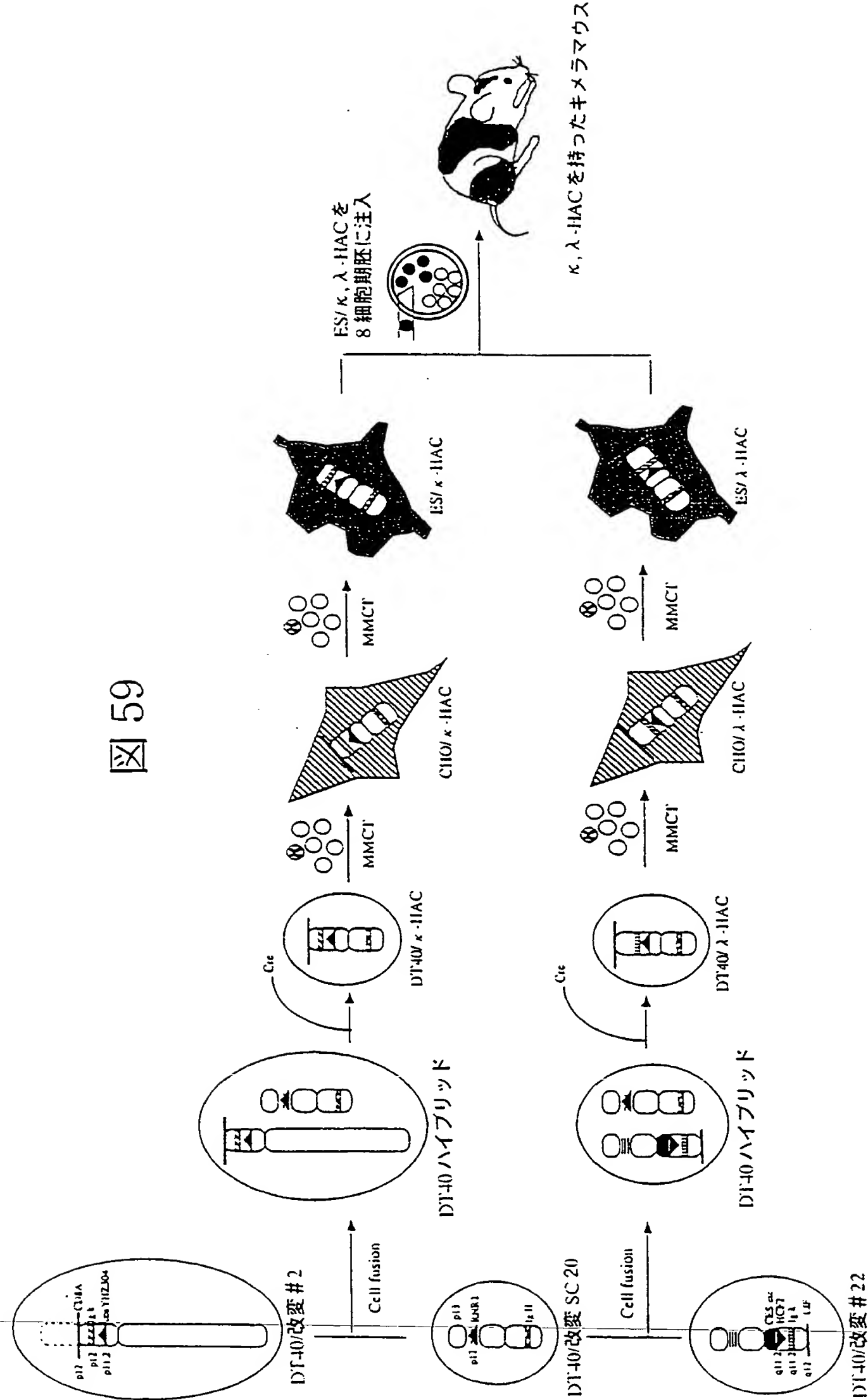
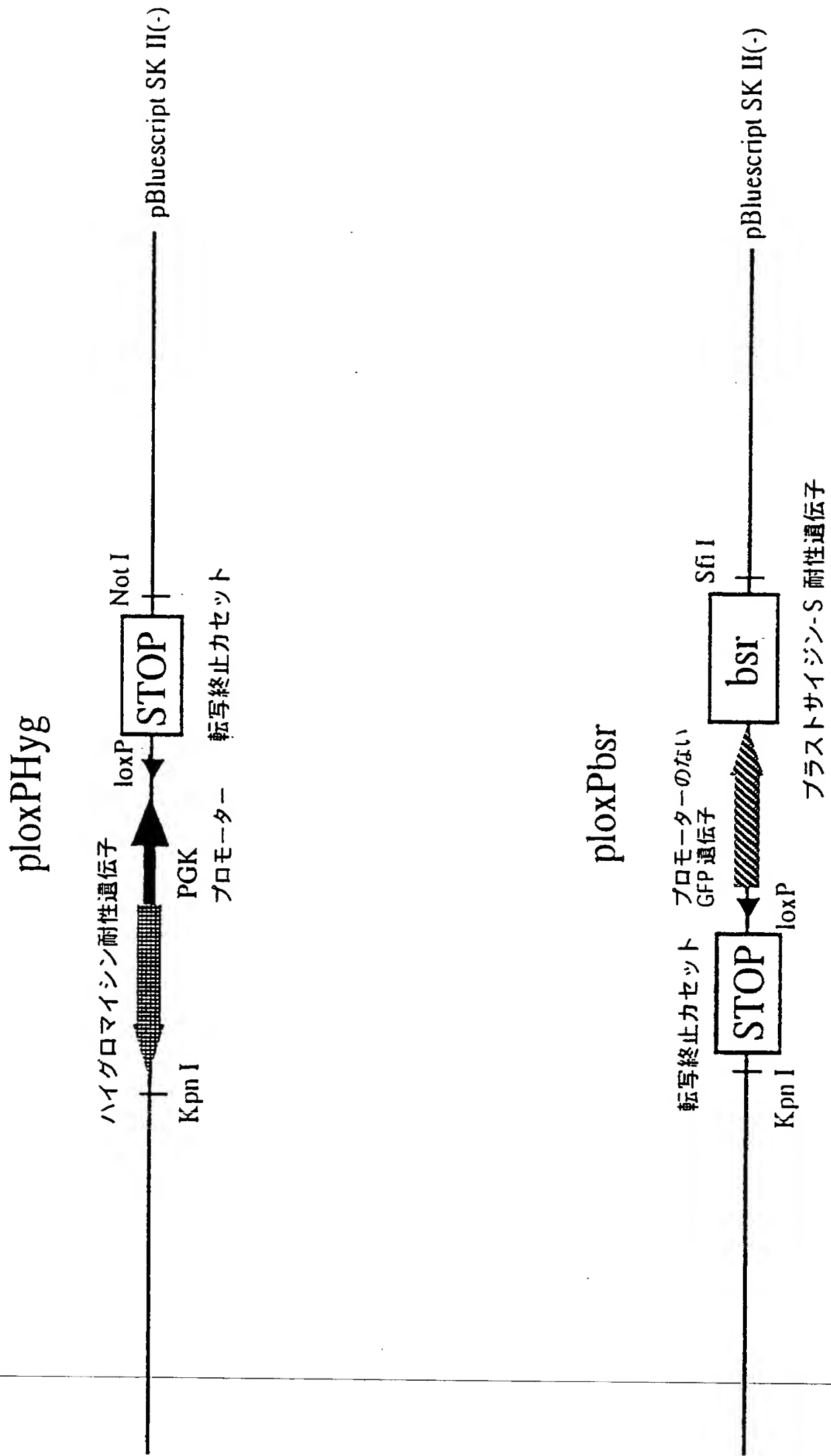




図 60





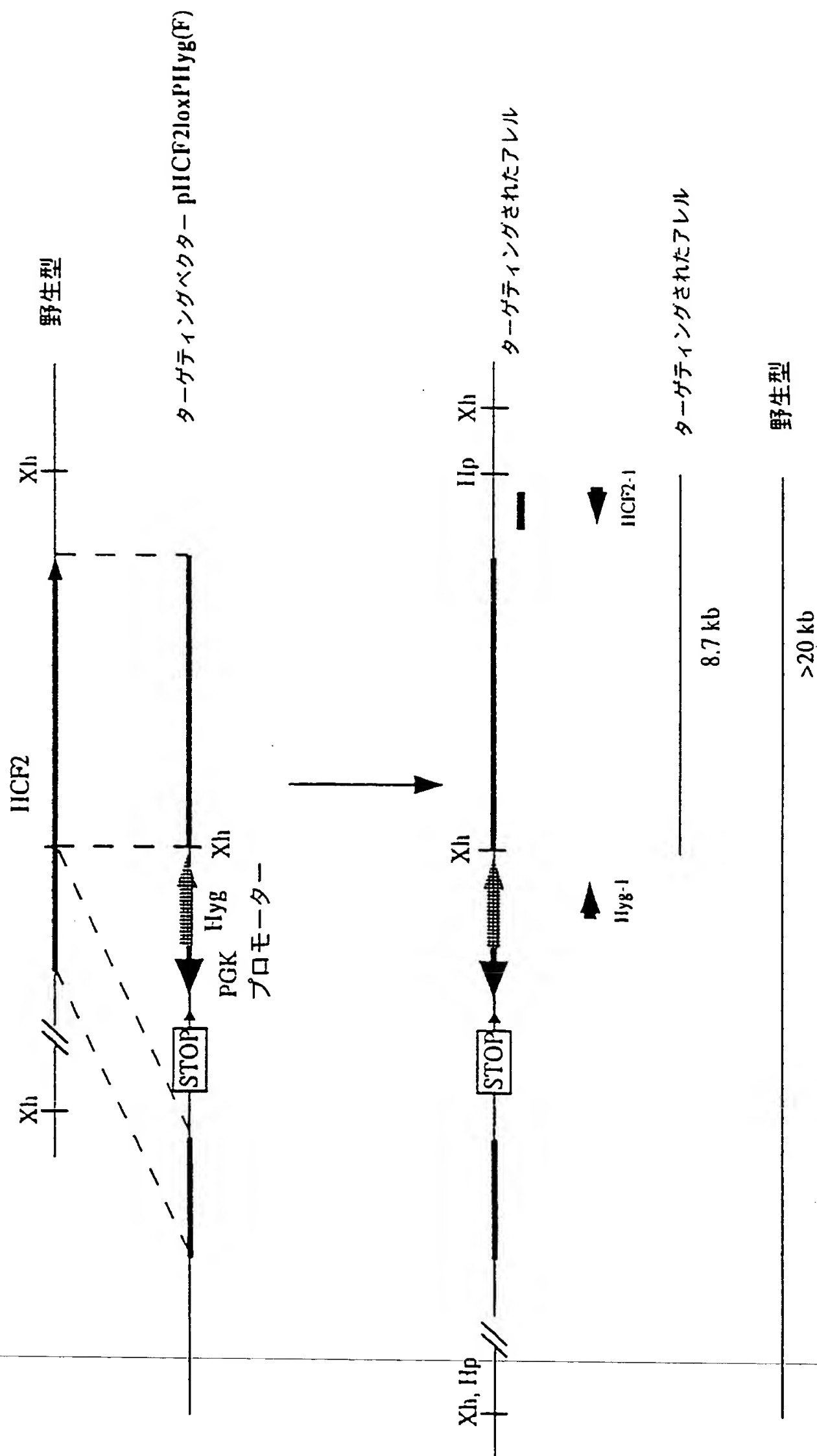


図 61





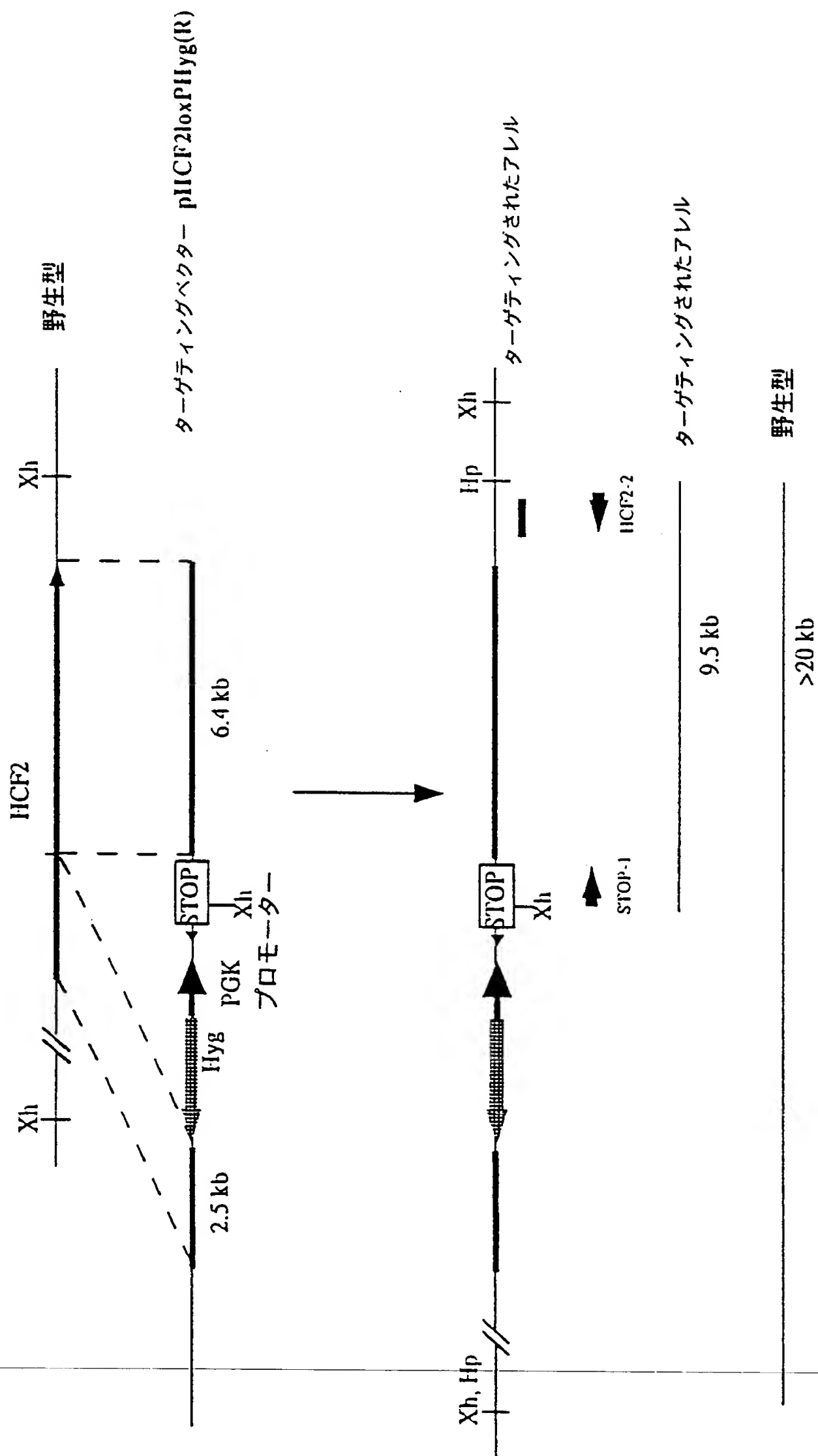


図 62



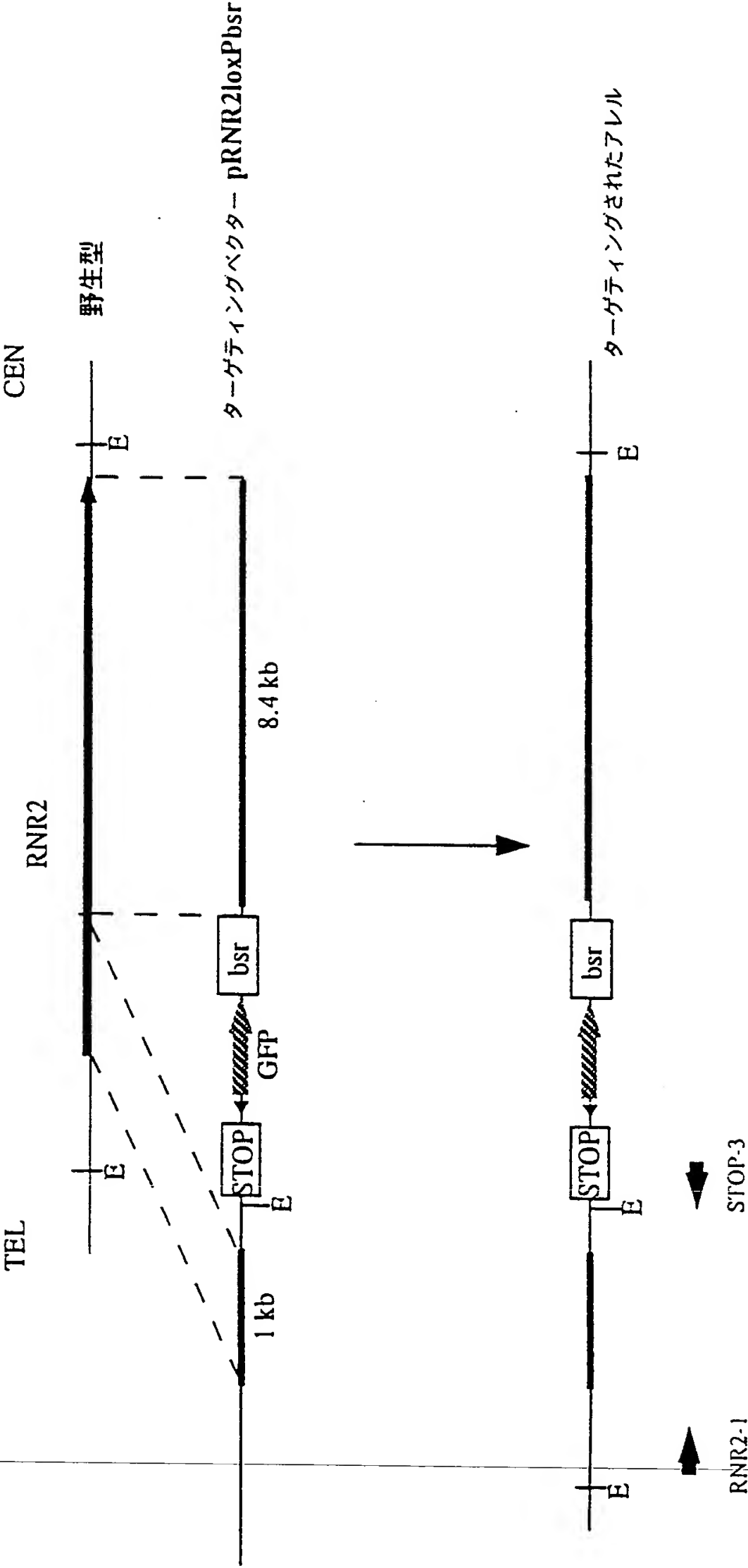


図 63



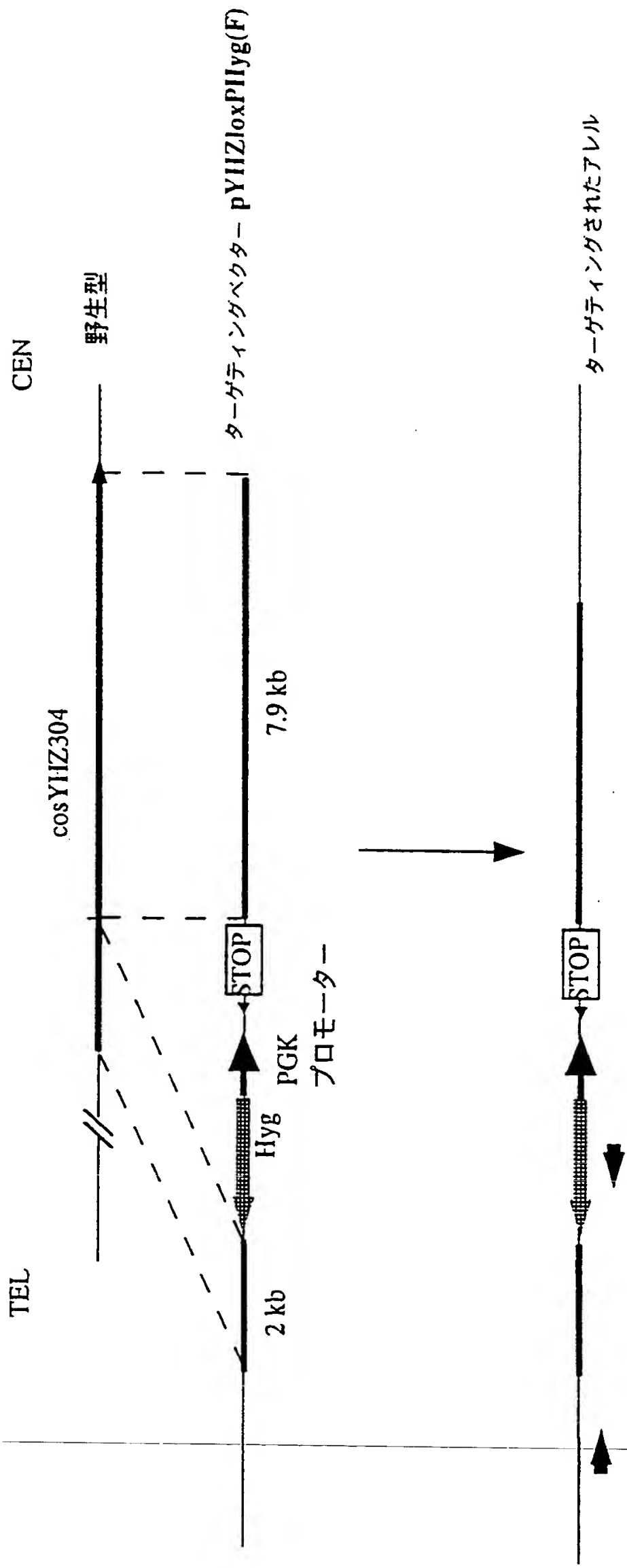
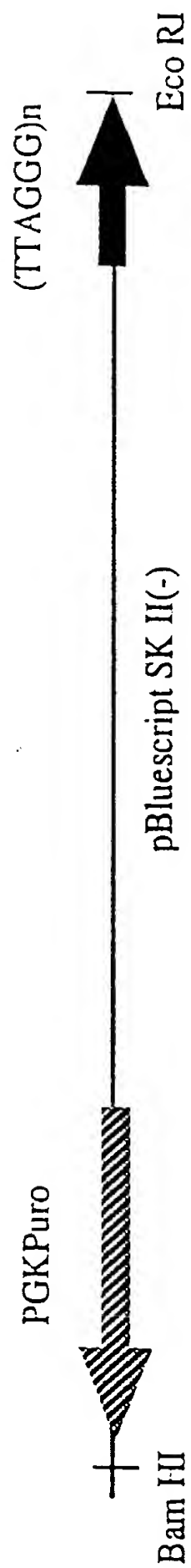


図 64



図 65







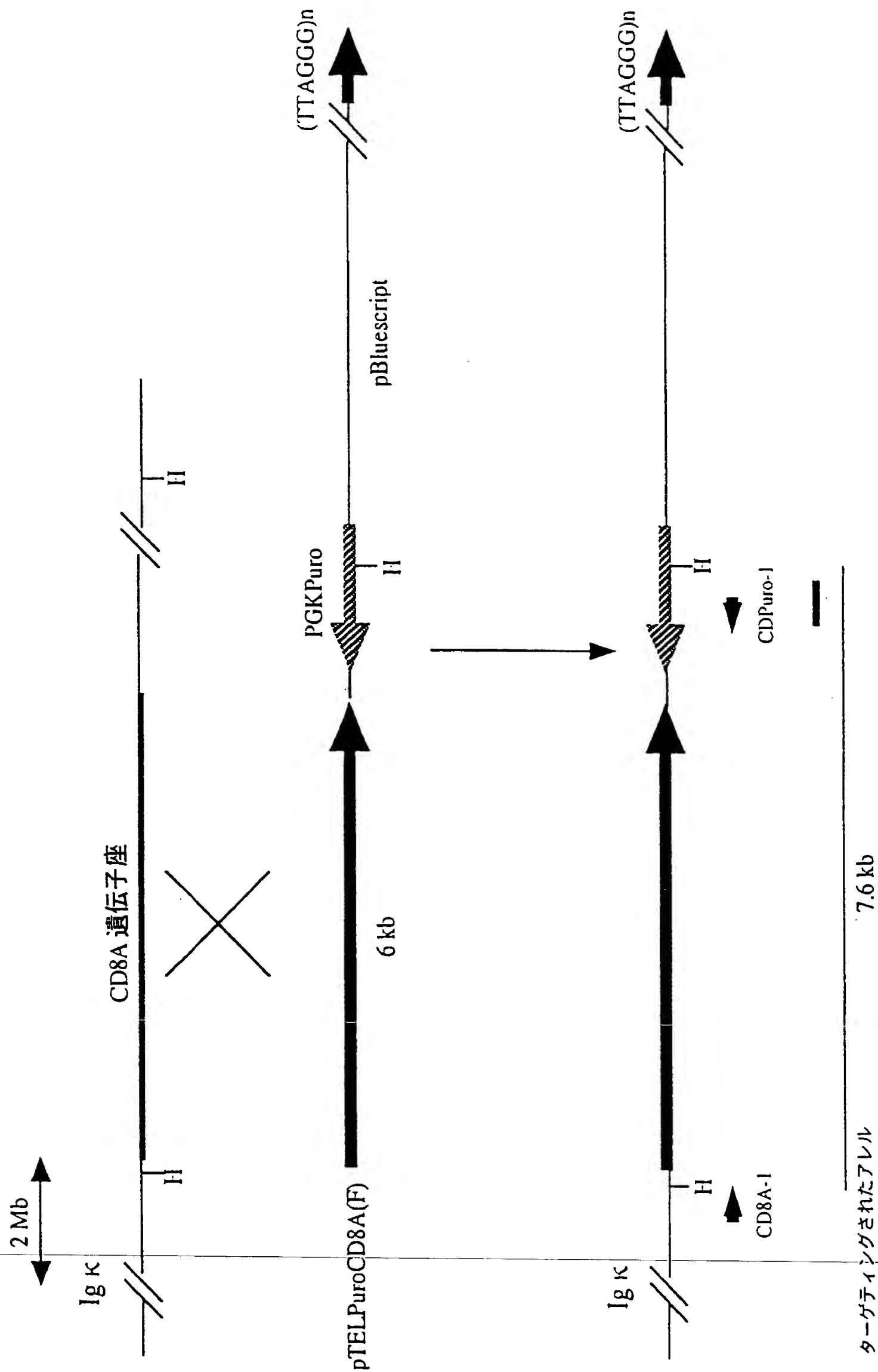
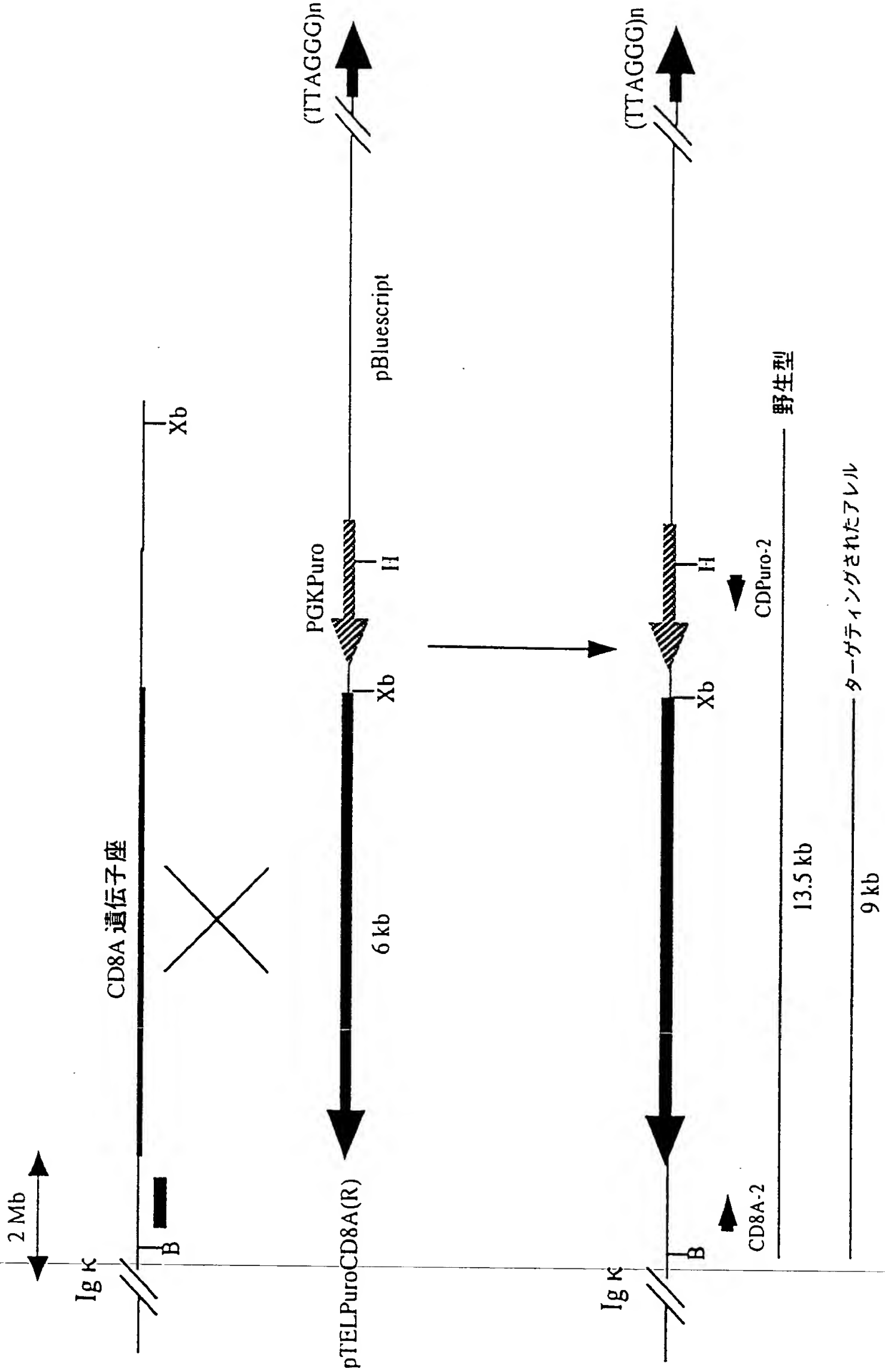
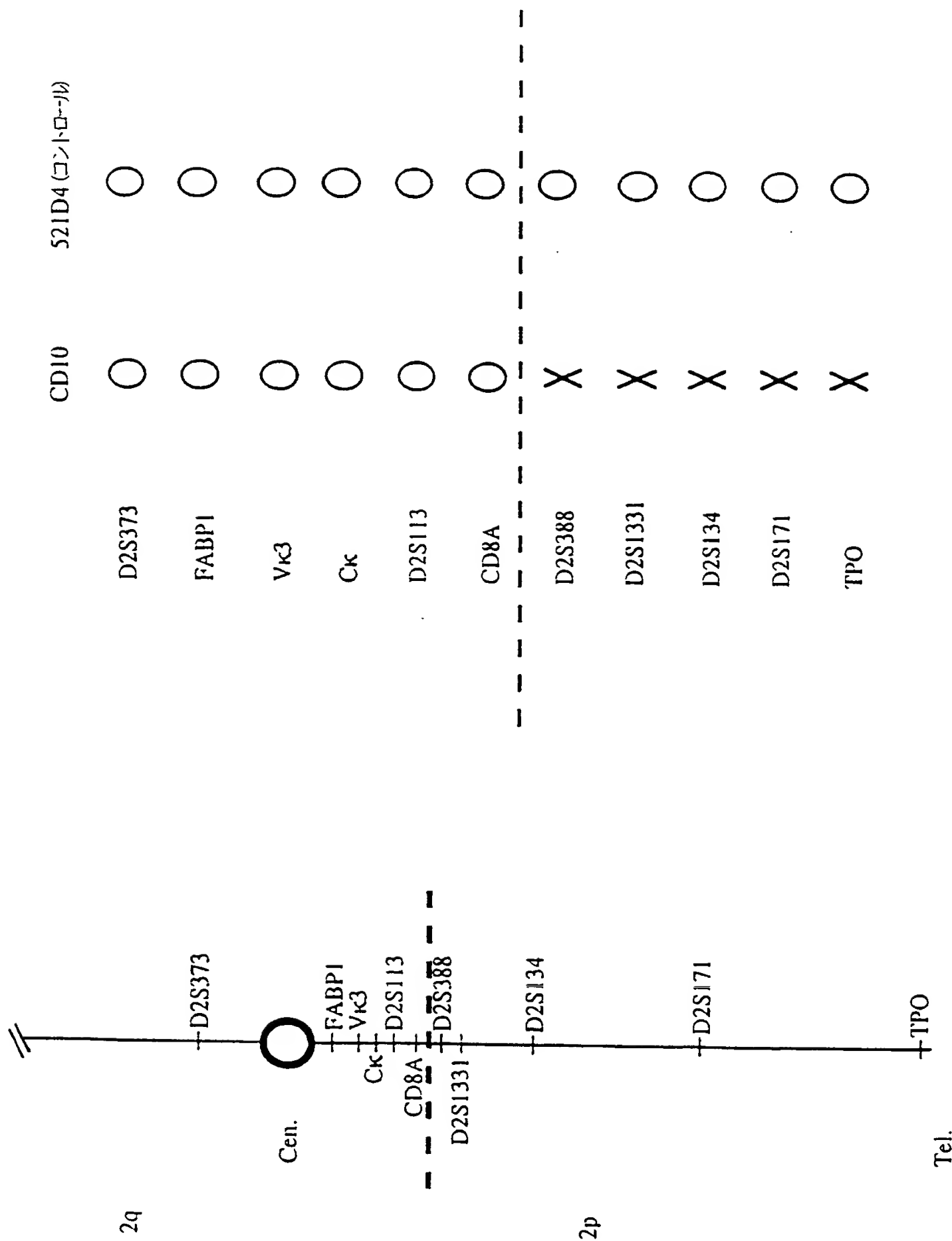


図 66









ヒト 2 番染色体



図 69

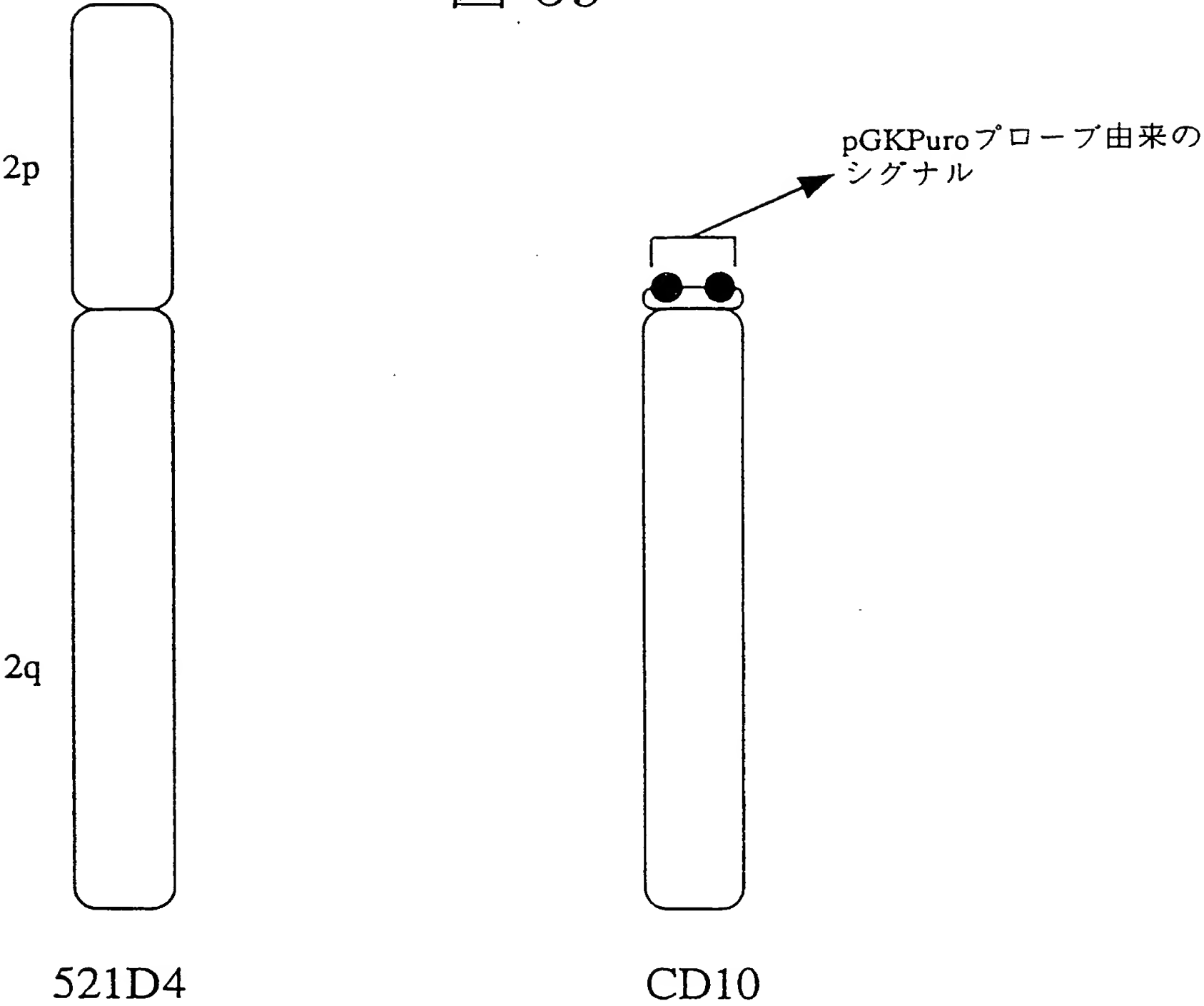






図 70

pBS185hisD

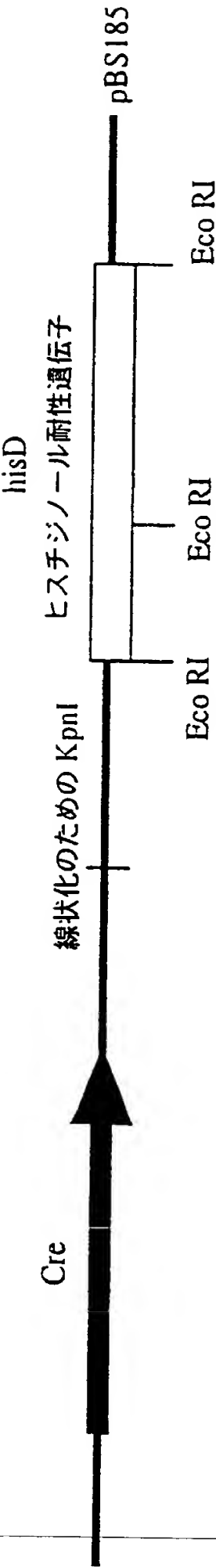
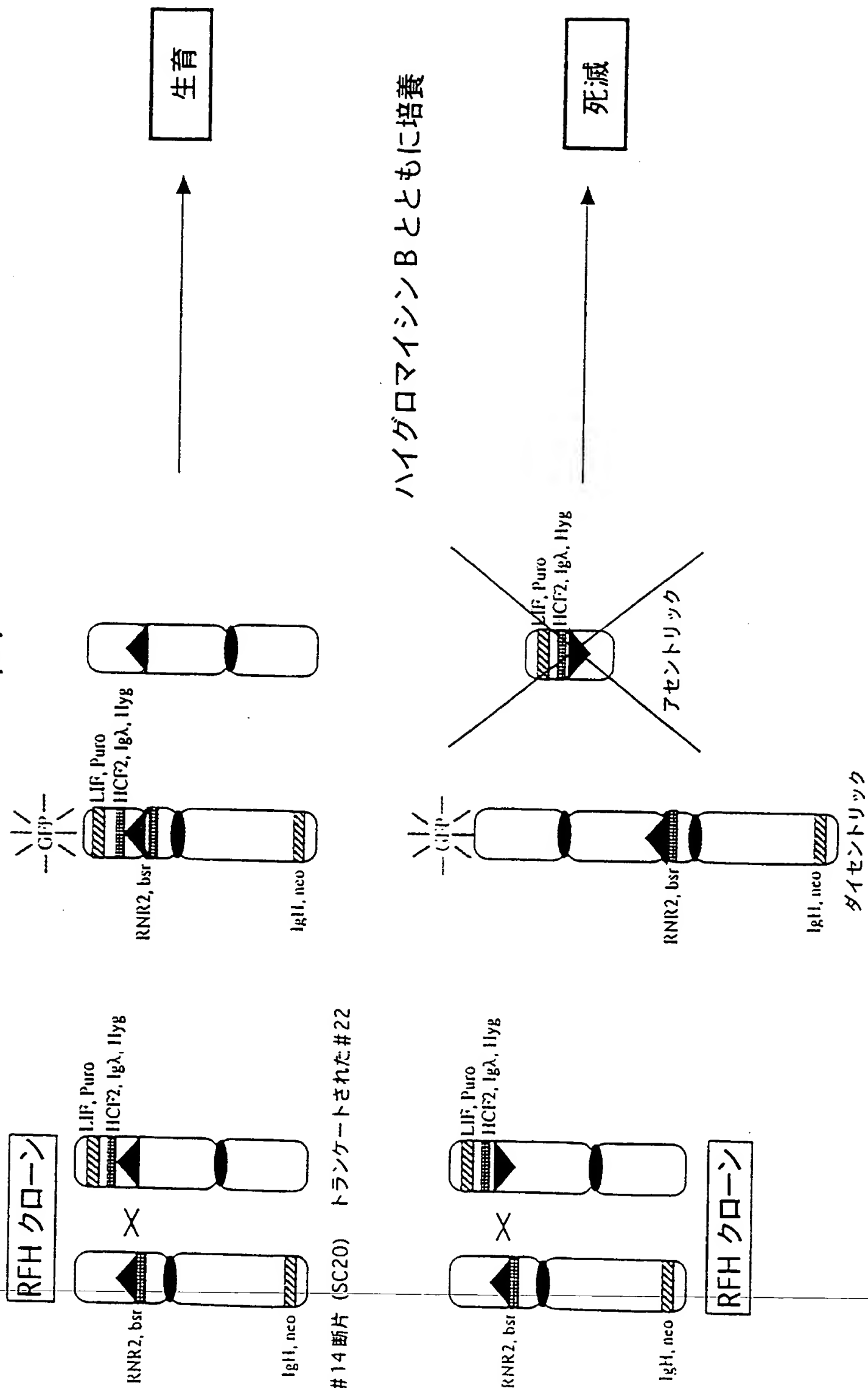
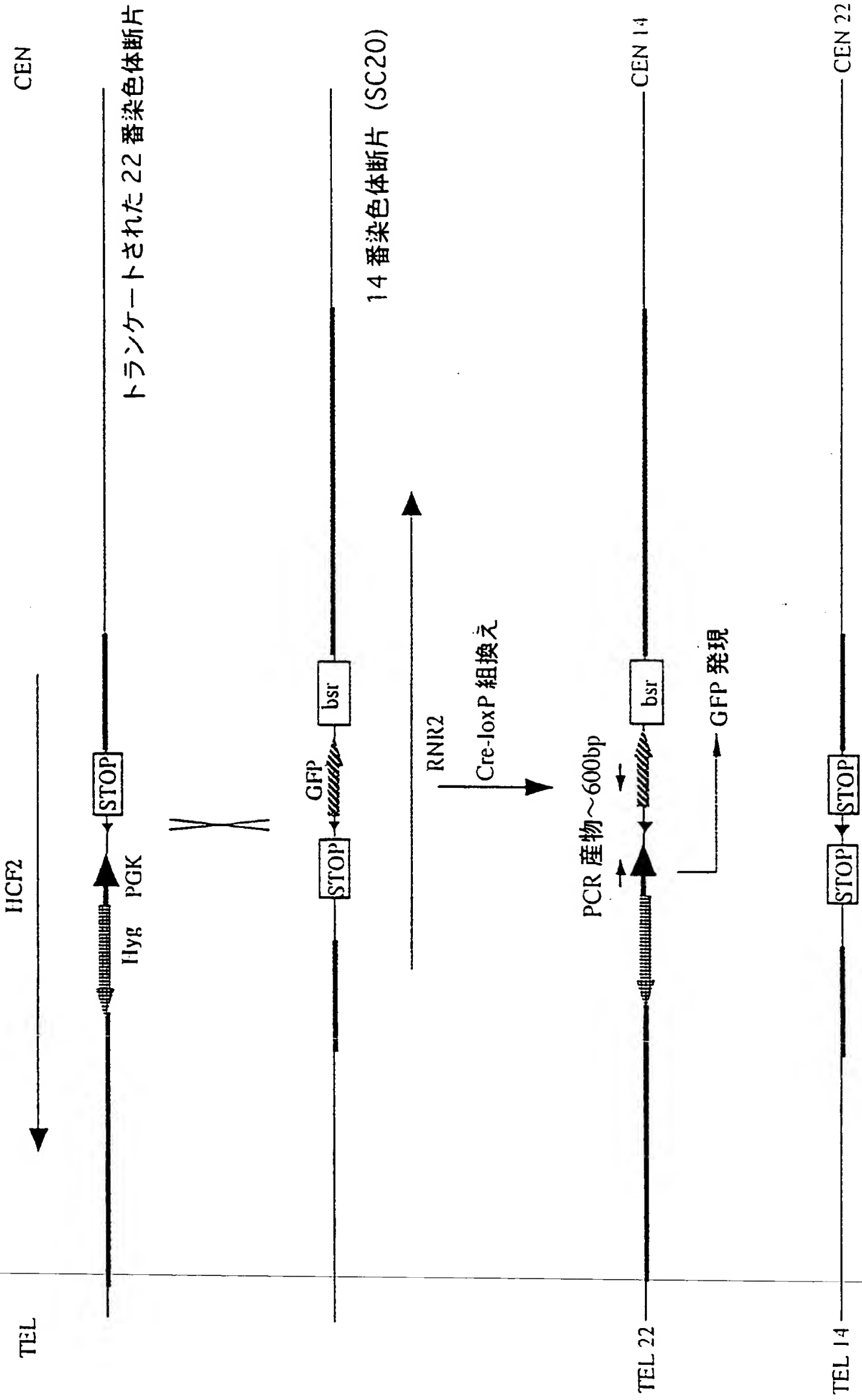




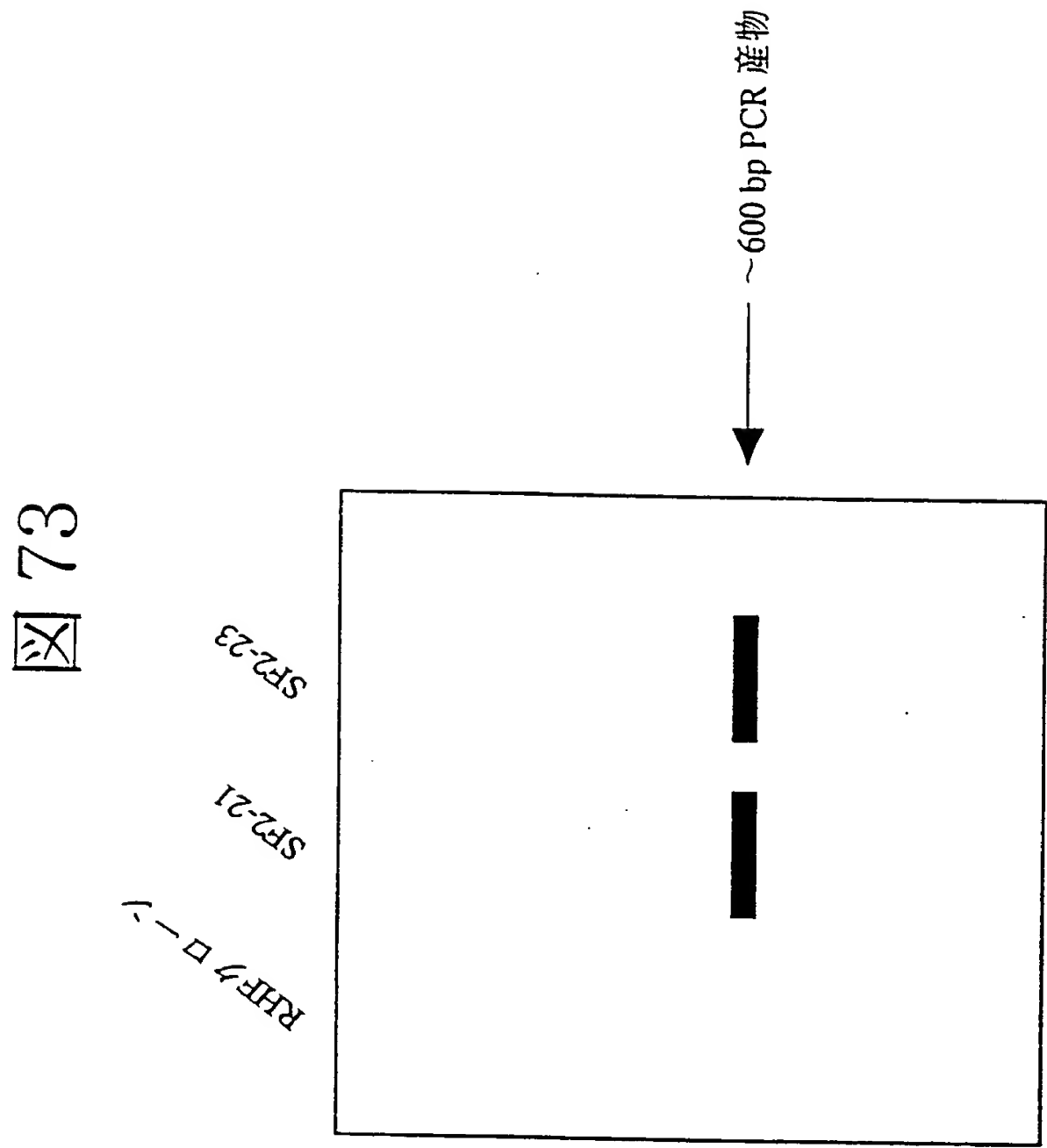
図 71











**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



考えられた。

SC20断片についてヒト染色体特異的プローブを用いたFISH解析 (Tomizukaら、Nature Genet. vol 16, 133-143(1997)) を行った。その結果このクローンにおいて、コントロール (インタクトな14番染色体を含む) と比較してプローブにハイブリダイズする染色体のサイズが小さくなっていることが観察された。すなわち、A9/SC20は断片化されたヒト14番染色体を含むことが確認された。さらにSC20断片がヒト14番染色体由来のセントロメア配列を含むかについて調べるため、A9/SC20細胞の染色体標本と、ジゴキシゲニン-11-dUTPで標識したヒト14番、22番セントロメア特異的な $\alpha$ サテライトDNA (コスモバイオより購入) をプローブとしハイブリダイズさせ、参考文献 (Tomizukaら、Nature Genetics, 16, 133-143) に記載された方法に従ってFISH解析を行った。その結果、上記プローブとハイブリダイズするシグナルが確認され、SC20断片がヒト由来のセントロメア配列を有することが明らかとなった (図36)。

#### (2) 14番染色体 (断片) のTT2F細胞への導入及びTT2F細胞における安定保持

14番染色体断片のTT2F細胞へのミクロセル移入は染色体供与細胞としてA9/SC20を用い、実施例9に示した方法で行った。G418 (300  $\mu$ g/ml) 選択の結果5株の耐性株を得た。これらのES細胞株についてと同様にPCR解析 (実施例68-(1)) およびFISH解析 (ヒト染色体特異的プローブ使用, Tomizukaら, 前記) によりヒト14番染色体断片の保持を確認した。FISH解析の結果を図37に示す。

マウス個体における導入ヒト染色体の安定保持は導入遺伝子の効率的発現および導入染色体の効率的な子孫への伝達に重要である。ES細胞株の宿主胚注入後は薬剤添加による選択ができないため、導入ヒト染色体が非選択条件でも安定に保持されることが望ましい。

SC20断片を含むTT2F(SC20)-21株についてG418非添加培地で長期間培養を行い、この条件におけるSC20断片の保持について検討した。

TT2F(SC20)-21株を選択培地 (G418 300  $\mu$ g/ml) で1週間培養した後、非選択培地で45日間継代培養した (1日おきに8倍希釈で植え継ぎ)。継代0、15、30、45日目に、300-1000個の細胞を35mmシャーレ6枚に播き、そのうち3枚を選択培地、3枚を非選択培地で約1週間培養してコロニーを数えた。選択条件の3枚分

のシャーレのコロニー数の合計（A）、非選択条件の3枚分のシャーレのコロニー数の合計（B）より染色体保持率（A/B）を求めた。比較のため、ヒト2番染色体由来W23断片を含むP-21（実施例40）についても同様（選択培地は $0.75 \mu\text{g/ml}$  puromycin入り）な実験を行い、その結果を図38に示した。図38に示した値は3回の独立した実験の平均値である。その結果SC20は45日間の非選択条件での培養後も95%以上という高い保持率を示した。一方、W23断片は同様の条件下で14%の保持率であった。

これまでに、ヒトY染色体由来の人工染色体（ヒトY由来セントロメアを含む）をCHO（ハムスター線維芽細胞）やDT40（ニワトリBリンパ球細胞）、マウスES細胞に移入した報告がある（Shenら, Hum. Mol. Genet. 6, 1375-1382）。非選択培養下において、その人工染色体はCHOとDT40では安定に保持されていたが、マウスES細胞中では再編成によりマウスのセントロメアを偶然に獲得した染色体のみが、安定に保持されていた。このことから、ヒト由来セントロメアはマウスES細胞中で不安定であるという意見が提出された（Shenら, 前記）。

上記の結果はSC20の場合ヒト由来のセントロメアでありながら（実施例68-(1)）、マウスES細胞で非常に安定であることを示している。同様にヒトセントロメアを含むことが示唆されるW23断片（Tomizukaら, 前記）の場合不安定性が見られたことからES細胞におけるヒト由来染色体の安定性は染色体の種類により異なると考えられる。

以上の結果より、SC20断片はマウス個体への遺伝子導入用のベクターとして非常に有用であることが示された。

### （3）ヒト14番染色体（断片）を保持するES細胞株からのキメラマウス作製

実施例68-(2)で取得され、ヒト14番染色体断片の保持が確認されたG418耐性ES細胞株TT2F(SC20)-21を凍結ストックより立ち上げ、ICR（日本クレア社）雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10～12個注入した。ES細胞用培地（実施例9）で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス（日本クレア社）の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。

計188個の注入胚を移植した結果、22匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、

毛色において宿主胚（ICR）由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかにより判定される。誕生した22匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は20匹であった。うち2個体は毛色が完全に野生色の（ES細胞に由来する）キメラマウスであった。

この結果より、ヒト2番染色体部分断片を保持するES細胞株TT2F(SC20)-21はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

5週齢のキメラマウス2匹（TT2F(SC20)-21由来、キメラ率100%、C14m-16、-17）より採血し血清中のヒト抗体IgM、IgG濃度を（実施例14）と同様にELISA法を用いて定量した。結果を表25に示す。

表25 キメラマウス中のヒト抗体抗体重鎖濃度（ELISA）

キメラマウス	キメラ率%	IgM(mg/l)	IgG(mg/l)
C14m-16	100	7.9	1.0
C14m-17	100	6.0	1.3

両方のキメラマウス血清中にヒト抗体IgM、IgGが検出された。その値はより大きなヒト14番染色体断片を保持するキメラマウスの値（実施例14）と同等であった。すなわち、SC20断片に含まれるヒト抗体遺伝子は機能的であることが示された。

（4）ヒト14番染色体断片を保持するマウスES細胞（TT2F, X0）由来キメラマウスの子孫におけるヒト染色体保持の検出および血清中ヒト抗体 $\mu$ 鎖、 $\gamma$ 鎖の検出、定量

（実施例68-(3)）で得られた雌キメラマウスのうちC14m-16、C14m-17（共に毛色のキメラ率100%）について雄ICRマウスとの交配によりES細胞由来の子孫が誕生するかを検討した。この交配においてICR雄マウス（アルビノ、劣性）由来精子により受精したキメラマウス中のTT2F細胞（野生色：優性）由来の卵子からは野生色、ICR由来卵子からは白色の子マウスが誕生する。この交配によって得られた生存可能な子マウス計30匹のすべてがES細胞由来の毛色である野生色を示し

ES細胞の効率的な生殖系列への伝達が示された。これらの子マウスの尻尾より調製したゲノムDNAについてヒト染色体断片の保持をPCR法により検討した。TT2F(SC20)-21で存在が確認されている3種のプライマー (IGVH3, IgM, D14S543) についてPCR増幅を行なった結果、30匹中10匹 (33%) においてTT2F(SC20)-21で検出された3種のマーカーの存在が確認された。すなわち、ヒト14番染色体断片を保持するTT2F細胞株TT2F(SC20)-21がキメラマウス中で機能的な卵子に分化し、その卵子由来のF1子孫にヒト14番染色体断片が伝達されたことが示された。

ヒト14番染色体を保持することが確認された10匹のキメラマウス子孫のうち9匹について血清中のヒト抗体IgM、IgGの検出、および定量を以下の通り行った。生後約4～8週齢のマウスより採血し、血清中のヒト抗体 $\mu$ 鎖および $\gamma$ 鎖を（実施例14）と同様にELISA法を用いて検出した。その結果（表26）、調べた全ての個体の血清中においてヒト抗体 $\mu$ 鎖および $\gamma$ 鎖が検出された。すなわち、キメラマウスから生まれたF1子孫においてもヒト抗体重鎖遺伝子が機能することが確認された。

表26 キメラマウス中のヒト抗体IgMおよびIgG濃度 (ELISA)

親キメラマウス	マウス個体番号	IgM(mg/l)	IgG(mg/l)
C14m-16	16-5	12.9	2.2
C14m-16	16-14	3.5	2.2
C14m-16	16-16	4.1	2.0
C14m-16	16-17	5.5	3.9
C14m-17	17-7	5.7	1.0
C14m-17	17-8	3.6	1.2
C14m-17	17-19	3.5	0.75
C14m-17	17-22	2.4	1.4
C14m-17	17-23	5.3	1.9

さらに、F1子孫のうち雄3個体、雌4個体についてMCH(ICR)マウス（日本クレアより購入）と交配し、誕生したF2子孫について上記に示した尻尾DNAのPCR解

析及び、ヒト抗体 $\mu$ 鎖発現解析を行った。その結果、雄經由で30%（142匹中43匹ポジティブ）、雌經由で33%（60匹中20匹ポジティブ）のF2子孫にSC20断片が伝達したことが確認された。

これらの結果より、14番染色体断片（ヒト抗体重鎖遺伝子を含む）を保持し、ヒト抗体重鎖を発現する継代可能なマウス系統を確立することができた。

#### （5）ヒト14番染色体断片のマウス個体における安定保持

（実施例68-(4)）において取得されたSC20断片を保持するF1子孫3匹（表26中：16-5、17-8、17-23）をマウス個体におけるSC20断片保持率解析に用いた。マウスにコルセミド（100  $\mu$ g/ml）を0.3ml腹腔内注射し、頸椎脱臼により安楽死させ、脳、肝臓、脾臓、精巣、骨髓を摘出した。骨髓をのぞくすべての組織をPBS（-）で洗浄した後、組織を解剖用ハサミで細かく切り、KCl（0.075M）により15分間の低調処理、カルノア固定をした。カルノア固定の上清を用いて通常通り標本を作成した。FISH解析はヒト染色体特異的プローブ（Human COT-1 DNA）を用い、参考文献（Tomizukaら, Nature Genetics, 16, 133-143）に記載された方法に従って行った。脳、脾臓、肝臓、骨髓については任意に選んだ30個以上の間期核についてシグナルの検出されるもの（図39中 +）、検出されないもの（図39中 -）の数をカウントし保持率を算出した。精巣については、第一減数分裂期像、第二減数分裂期像、精子に分類し、各10個以上についてカウントし保持率を算出した。その結果、脳、肝臓では3個体とも100%近い保持率を示した。骨髓、脾臓では、保持率の低下が観察された。精巣では、第一減数分裂像で80~100%、精子で30~50%の結果が得られた。SC20断片が安定に保持されていると仮定すると理論的には第一減数分裂で100%、第二減数分裂と精子で50%となる。したがって、精巣でSC20断片は安定に保持されていると考えられた。

また、同時に尻尾より繊維芽細胞を調製し（実施例79）と同様にSC20断片の保持率を検討した。その結果は、16-5:98%、17-8:96%、17-23:98%であった（各々50核板についてテスト）。

#### （6）ヒト14番染色体断片（抗体重鎖遺伝子を含む）の導入による、抗体産生能欠損マウスの遺伝的救済

B リンパ球の発生に必須な抗体 $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトマウス（実施例67-(1)

)) は体液性免疫を担う成熟Bリンパ球が欠損していることにより抗体を産生することができない。この欠損を交配によるSC20断片（ヒト抗体重鎖遺伝子を含む）導入により救済できるかを検討するため、以下の実験を行った。

（実施例49）で作成した内在性抗体重鎖片側アレル欠損TT2F細胞株由来キメラマウスとMCH(ICR)マウスとの交配により得られた子孫のうち野性色を示すものについてサザン解析を行ない欠損アレルを保持する個体を選抜した。得られた抗体重鎖欠損ヘテロ接合体の雌個体と（実施例68-(4)）で得られたSC20断片を保持するF1子孫雄個体（17-7）を交配した。その結果得られた5匹の子マウスについてSC20断片保持検定のためのPCR解析、血清中ヒト抗体 $\mu$ 鎖、 $\gamma$ 鎖測定を行った

（実施例68-(4)）結果、#2、#3、#5の3個体がSC20断片を保持することが確認された（表27）。また、血清中マウス抗体 $\mu$ 鎖発現解析（実施例75）の結果、#1、#3がマウス $\mu$ 鎖陰性すなわち内在性抗体重鎖欠損についてホモであることが示された（表27）。これは5個体の尻尾より調製したDNAを用いたサザン解析（実施例49参照）の結果と一致した。マウス、ヒト抗体重鎖共に検出されない個体#1と比較して、抗体重鎖欠損ホモかつ、14番染色体保持の遺伝子型を持つ個体#3においては非常に高濃度のヒト抗体 $\mu$ 鎖（310 mg/l）、 $\gamma$ 鎖（860 mg/l）が検出された。また、（実施例29）の方法に従い、ヒト $\gamma$ サブクラスの定量を行い、4種のサブクラス（ $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ ）をすべて検出した。特にヒト $\mu$ 鎖の濃度は野性型マウスにおけるマウス $\mu$ 鎖の濃度（Mendezら, Nature Genet. 15, 146-156 (1997)）に匹敵する。すなわち、この個体においては内在性重鎖遺伝子の欠損による抗体産生不能（Bリンパ球の欠損：参考文献 Kitamuraら, Nature, 350, 423-, 1991）という症状がヒト14染色体断片SC20（抗体重鎖遺伝子を含む）の導入により治療され、抗体産生能及びBリンパ球産生能が回復したことを示している。

表 27

個 体 番 号	SC20断片保持	マウス $\mu$ 鎖	ヒト IgM(mg/l)	ヒト IgG(mg/l)
1	-	-	検出限界以下	0.33
2	+	+	8.4	5.3
3	+	-	310	860
4	-	+	測定せず	測定せず
5	+	+	4.8	0.86

(実施例69) ヒト22番染色体(断片) 導入ES細胞由来キメラマウス子孫におけるヒト染色体の保持

(1) ミクロセル融合を利用したヒト22番染色体の断片化

ヒト2番染色体断片(実施例42)、ヒト14番染色体断片(実施例68-(4))は共にマウスへの導入後、子孫への伝達が観察されたことから、ヒト22番染色体についても断片化することによりマウスにおける子孫への伝達の可能性が高まることが予想される。ミクロセル融合による受容細胞へのヒト染色体移入の際、40~80%の移入クローンは融合時に断片化されたヒト染色体を保持することが観察されている(押村ら、蛋白質 核酸 酵素 vol. 35, No. 14 1990)が、この現象を利用してヒト22番染色体の断片化を試みた。

6-1株(実施例35)を染色体供与細胞、野性型マウスA9細胞を受容細胞としたミクロセル融合実験(実施例1)を行った結果、73個のG418耐性クローンが得られた。得られたクローンよりゲノミックDNAを調製し、Igλプライマー(実施例2)を用いたPCRによりスクリーニングした。ヒトIgλ遺伝子を保持していた67クローンについて、22番染色体上の8種のマーカー(D22S315, D22S275, D22S280, D22S278, D22S283, D22S272, D22S282, D22S274; 22番染色体上での順序はNature, vol 377, 367-379, (1995)を参照。プライマーの塩基配列はGenbank等のデータベースより入手)特異的プライマーを用いたPCR解析を行った。その結果25クローンにおいてマーカーの一部が消失していたことから、これらのクローンにおいて22番染色体が断片化していると考えられた(図40)。中でも、クローン#22はIgλとD22S315、#28はIgλ以外のマーカーが消失しているため、かなり小さな断片になっていると考えられる(図40)。クローン#28についてヒト染色体特異的プローブを用いたFISH解析(実施例18)を行った結果を図41に示す。このクローンにおいて、コントロール(インタクトな22番染色体を含む)と比較してプローブにハイブリダイズする染色体のサイズが小さくなっていることが観察される。すなわち、ミクロセル融合時に起こる染色体の断片化により、抗体λ遺伝子を含むヒト22番染色体断片を取得することができた。

(2) 22番染色体(断片)のTT2F細胞への導入

22番染色体(断片)のTT2F細胞へのミクロセル移入は実施例2に示した方法で



行った。染色体供与細胞としては#22、#28、および6-1を用いた。クローン#22、A9/#22(6-1)についてはピューロマイシン ( $0.75 \mu\text{g/ml}$ ) 選択、クローン#28についてはG418 ( $225 \mu\text{g/ml}$ ) 選択を行いそれぞれ13株 (クローン#22より)、5株 (6-1より) および3株 (クローン#28より) の薬剤耐性株を得た。これらのES細胞株について (実施例69-(1)) と同様にPCR解析およびFISH解析によりヒト22番染色体 (断片) の保持を確認する。

(3) ヒト22番染色体 (断片) を保持するES細胞株からのキメラマウス作製

実施例69-(2) で取得され、ヒト22番染色体の保持が確認された薬剤耐性ES細胞株について (実施例3) の方法によりキメラマウスを作製する。キメラマウスにおけるヒト22番染色体 (断片) 保持確認は (実施例4) の方法により行う。

(4) ヒト22番染色体 (断片) の子孫への伝達

ヒト22番染色体 (断片) を保持するキメラマウスとICRマウスを混合して交配する。誕生する野生色の子マウスの尻尾より調製したゲノムDNAについてヒト22番染色体断片の保持をPCR法により検討する (実施例30、42、43参照)。ヒト22番染色体あるいはその部分断片を保持するマウスES細胞株は (実施例42) 及び (実施例43) で示した通りにキメラマウス中で機能的な卵子あるいは精子に分化し、それ由来の子孫にヒト22番染色体 (断片) が伝達可能である。すなわちヒト抗体軽鎖入遺伝子を含む22番染色体 (断片) を保持する継代可能なマウス系統を確立することができる。

(実施例70) ヒト2番染色体断片及び14番染色体 (断片) を同時に保持するマウス個体の交配による作成

(実施例42) あるいは (実施例43) で得られたヒト2番染色体断片を保持するマウス系統と (実施例68) で得られたヒト14番染色体 (断片) を保持するマウス系統を交配することにより生まれる子マウスの尻尾より調製したゲノムDNAをPCR法等 (実施例9、42、43) により解析して、ヒト2番染色体部分断片及びヒト14番染色体 (断片) を同時に保持する個体を得る。

(実施例71) ヒト22番染色体 (断片) 及び14番染色体 (断片) を同時に保持する

マウス個体の交配による作成

(実施例69) で得られるヒト22番染色体(断片)を保持するマウス系統と(実施例68) で得られるヒト14番染色体(断片)を保持するマウス系統を交配することにより生まれる子マウスの尻尾より調製したゲノムDNAをPCR法等(実施例30、42、43)により解析して、ヒト22番染色体(断片)及びヒト14番染色体(断片)を同時に保持する個体を得る。

(実施例72) ヒト2番染色体断片、14番染色体(断片)及び22番染色体(断片)を同時に保持するマウス個体の交配による作成

(実施例71) で得られるヒト22番染色体(断片)及びヒト14番染色体(断片)を保持するマウス系統を(実施例42、43) で得られたヒト2番染色体断片を保持するマウス系統と交配することにより生まれる子マウスの尻尾より調製したゲノムDNAをPCR法等(実施例9、30、42、43)により解析して、ヒト22番染色体(断片)及びヒト14番染色体(断片)及びヒト2番染色体部分断片の3種のヒト染色体を同時に保持する個体を得る。あるいは(実施例70) で得られるヒト2番染色体(断片)及びヒト14番染色体(断片)を保持するマウス系統と(実施例69) で得られるヒト22番染色体断片を保持するマウス系統と交配することによっても同様に3種のヒト染色体を同時に保持するマウス個体を得る。

(実施例73) 完全なヒト抗体を主として産生するマウス系統の交配による作成

ヒト2番+14番(実施例70)、14番+22番(実施例71)、2番+14番+22番

(実施例72) 染色体を保持するマウス系統を内在性抗体重鎖、軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を欠損しているマウス系統と繰り返し交配し、ヒト2番+14番、14番+22番、または2番+14番+22番染色体を保持し、かつ内在性抗体重鎖遺伝子及び軽鎖 $\kappa$ 遺伝子欠損についてホモであるマウス系統をPCR解析等(実施例9、30、42、43)により選抜する。これらの系統においては、主として完全なヒト抗体が産生される(Greenら, Nature Genetics, 7, 13-, 1994, Lonbergら, Nature, 368, 856-, 1994)。

以下、ヒト2番染色体断片及びヒト14番染色体断片を保持し、かつ内在性抗体

重鎖遺伝子及び抗体 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損についてホモであるマウス系統の確立について示す。交配に用いた4つの系統及びそれぞれの系統の持つ遺伝子型の検定法は以下の通りである。

(1) 実施例42で得られたヒト2番染色体断片を保持するマウス系統：実施例42に示した尻尾DNAのPCR解析および血清中ヒト抗体 $\kappa$ 鎖発現を指標としてヒト2番染色体断片保持を検定

(2) 実施例68-(4)で得られたヒト14番染色体断片を保持するマウス系統：実施例68-(4)に示した尻尾DNAのPCR解析および血清中ヒト抗体 $\mu$ 鎖発現を指標としてヒト14番染色体断片保持を検定

(3) 実施例67-(1)で得られた抗体重鎖ノックアウトマウス系統：実施例67-(1)に示した尻尾DNAのサザン解析及び、血清中マウス抗体 $\mu$ 鎖発現の有無（実施例75）により重鎖欠損ホモあるいはヘテロ個体を検定

(4) 実施例80で得られた抗体 $\kappa$ 鎖ノックアウトマウス系統：実施例80に示した尻尾DNAのサザン解析により $\kappa$ 鎖欠損ホモあるいはヘテロ個体を検定

上記の4系統を互いに交配することにより、これら4つの遺伝子型（2番染色体断片保持、14番染色体断片保持、抗体重鎖欠損ホモあるいはヘテロ、抗体 $\kappa$ 鎖欠損ホモあるいはヘテロ）を同時に保持する系統の確立を行った。上記4系統を出発材料として数回の交配を経た後、『14番染色体断片保持、抗体重鎖欠損ホモ、抗体 $\kappa$ 鎖欠損ヘテロ』の遺伝子型を持つ雄個体と『2番染色体断片保持、抗体重鎖欠損ホモ、抗体 $\kappa$ 鎖欠損ホモ』あるいは『2番染色体断片保持、抗体重鎖欠損ホモ、抗体 $\kappa$ 鎖欠損ヘテロ』あるいは『2番染色体断片保持、抗体重鎖欠損ヘテロ、抗体 $\kappa$ 鎖欠損ホモ』のいずれかの遺伝子型を持つ雌個体の交配を行った。その結果、個体HK23『2番染色体断片保持、14番染色体断片保持、抗体重鎖欠損ホモ、抗体 $\kappa$ 鎖欠損ヘテロ』及び個体HK29『2番染色体断片保持、14番染色体断片保持、抗体重鎖欠損ヘテロあるいは野生型、抗体 $\kappa$ 鎖欠損ヘテロ』を得た。同じ交配により得られた『2番染色体断片保持、14番染色体断片保持、抗体重鎖欠損ヘテロあるいは野生型、抗体 $\kappa$ 鎖欠損野生型』の遺伝子型の個体(HK28)も含めて図42に血清中各抗体濃度及び遺伝子型を示す。HK23の血清中にはヒト $\mu$ 鎖とヒト $\kappa$ 鎖からなる完全なヒト抗体が18mg/lの濃度で検出された（実施例38）。

ここで得られた個体同士を交配することにより、『2番染色体断片保持、14番染色体断片保持、抗体重鎖欠損ホモ、抗体κ鎖欠損ホモ』の遺伝子型を持つ個体を作製することができる。この系統においては、内在性κ鎖遺伝子の欠損がヒト2番染色体断片に含まれるヒト抗体κ鎖遺伝子によって代替される（Lonbergら、Nature, 368, 856-, 1994）ため、HK23よりさらに高い濃度のヒト抗体κ鎖が発現すると考えられる。また、ヒト重鎖とκ鎖からなる完全なヒト抗体の濃度もさらに上昇すると考えられる。

（実施例74）交配により得られるヒト抗体遺伝子を含むヒト染色体を保持するマウス系統からのヒト抗体産生ハイブリドーマ取得

（実施例25）と同様に（実施例42、43、68、69、70、71、72、73）で得られるヒト抗体遺伝子を含むヒト染色体を保持するマウス個体に目的とする抗原で免疫し、脾臓を取り出し、ミエローマ細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを作成する。1～3週間培養し培養上清をELISA法で解析する。ELISA法は（実施例14、15、21、22、25、33、34、37、38）に示した方法で行ない、ヒト抗体陽性及びヒト抗体陽性かつ免疫した抗原特異的クローンを得る。

（実施例75）マウス抗体重鎖両側アレル破壊TT2F細胞株由来キメラマウスの血清中のマウスIgMの検出および定量

（実施例51）で取得されたマウス抗体重鎖両側アレル破壊TT2F細胞株（#131-3）より（実施例40）に示した方法で誕生した子マウスのうちキメラ率がそれぞれ0%、50%、99%の3個体について血清中のマウスIgMの検出および定量を行った。生後約2週齢のキメラマウスより採血し血清中のマウスIgM濃度を（実施例14）のELISA法を用いて定量した。PBSで希釈した抗マウスIgM抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., 01-18-03）を固定し、次いで5%FBSを添加したPBSで希釈した血清試料を加えた。ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., 074-1803）を加え、TMBZを基質とし、450 nmの吸光度を測定した。精製されたマウスIgM（ファーミンジェン、03081D）を標準とし段階的にFBS添加のPBSで希釈した。結果を表28に示す。マウス抗体重鎖の両側ア

レルが破壊されたTT2F細胞由来のキメラマウスのうち、キメラ率が99%のものはマウスIgM濃度が低く、ES細胞のマウス重鎖遺伝子がほとんど機能しないことが確認された。

表28. キメラマウス中のマウスIgM濃度 (ELISA)

キメラ率%	I g M (mg/l)
0	12
50	11
99	1.5

(実施例76) ES細胞の抗体遺伝子軽鎖 $\kappa$ ノックアウト用ターゲティングベクターの作製

実施例48-1と同様にしてピューロマイシン耐性遺伝子の両側にLoxP配列を入れたLoxP-PGKPuroプラスミドを作製した。pPGKPuroプラスミドDNA (Watanabe ら, Biochem Biophys Res Commun 213: 130-137 (1995), Peter W. Laird, Whitehead Institute for Biochemical Research and Massachusetts institute of technology, Dept. of Biology, Cambridge, MAより分与) より制限酵素Sallでピューロマイシン耐性カセットPGKPuroを切り出し、平滑化した。LoxP配列を含むプラスミドのSmaIおよびEcoRV 切断部位へPGKPuroを挿入し、プラスミドpLoxP-PGKPuroを得た(図30)。さらに、実施例48と同様にしてマウス抗体軽鎖 $\kappa$ J領域および定常領域を含むゲノムDNAの定常領域が含まれるDNA断片をLoxP-PGKPuro遺伝子と置き換えた(図31)。

(実施例77) 抗体軽鎖ヘテロ接合体(かつ抗体重鎖欠損ホモ接合体)マウスES細胞からの抗体軽鎖遺伝子両アレル破壊株の取得

(1) 実施例58で取得した抗体軽鎖欠損ヘテロ接合体TT2F細胞株(HD43)について

てピューロマイシン耐性遺伝子の挿入によって、さらに両側アレルが共に破壊された株を取得した。

実施例76で作製した抗体軽鎖ターゲティングベクターを制限酵素KpnIで線状化し、実施例58と同様にHD43株を形質転換した。ピューロマイシン濃度0.75  $\mu$ g/mlで選択培養を行い、7～9日後に生じたコロニーをピックアップし、実施例49に示した方法で凍結保存、ゲノムDNAを取得した。ピューロマイシン耐性株ゲノムDNAを制限酵素EcoRI（宝酒造）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザン解析を行い、実施例48-4に示したプローブで相同組み換え体を検出した（実施例58, 59）。その結果、解析した74株中4株の抗体軽鎖両アレル破壊株を得た。これらのクローンは通常の培養条件において、遺伝子破壊以前のTT2F株と比較して、増殖速度及び形態に変化が見られず、キメラマウス形成能を保持していることが示唆される。

## （2）抗体重鎖欠損ホモ接合体かつ抗体軽鎖遺伝子両アレル破壊株からのキメラマウス作製

（実施例77-(1)）で得られた抗体軽鎖両アレル破壊株TT2F細胞株HD43P-10を凍結ストックより立ち上げ、ICR（日本クレア社）雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10～12個注入した。ES細胞用培地（実施例9）で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス（日本クレア社）の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。

計161個の注入胚を移植した結果、37匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚（ICR）由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかにより判定される。誕生した37匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は9匹であった。うち4個体は毛色の80%以上が野生色の（ES細胞に由来する）キメラマウスであった。

この結果より、抗体軽鎖両アレル破壊株ES細胞株HD43P-10は高いキメラ形成能を保持していることが確認された。

（実施例78）抗体軽鎖欠損ホモ接合体（かつ抗体重鎖欠損ホモ接合体）TT2F細胞

株からのG418耐性及びピューロマイシン耐性マーカー遺伝子の除去

(実施例77) で取得され、高いキメラ形成能を保持していることが確認された抗体軽鎖両側アレル破壊株HD43P-10 (ピューロマイシン、G418耐性株) のピューロマイシン及びG418耐性マーカー遺伝子を(実施例52) で示した手順により除去した。G418耐性マーカー遺伝子の両側に挿入したloxP配列(実施例48-1) の間で部位特異的組換えを起こすCreレコンビナーゼ遺伝子を含む発現ベクターpBS185 (BRL) を(実施例52) の方法に従い上記の株へ導入した。(実施例52) と同様に得られるピューロマイシン ( $0.75 \mu\text{g/ml}$ ) 感受性株(6株)を35mmシャーレでコンフルエントになるまで増殖させ、その3/5を0.5mlの保存用培地 (ES培地+10%DMSO<シグマ>) に懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。残りの2/5は2分して12穴ゼラチンコートプレート2ウェルに播種し、一方は非選択培地、一方は $300 \mu\text{g/ml}$ のG418存在下で2日間培養した。その結果、G418存在下で死滅する5株のピューロマイシン、G418感受性株を得た。

(実施例79) ヒト2番染色体断片を保持するマウス系統とC57BL/6系統との交配による血清中ヒト抗体 $\kappa$ 鎖発現の上昇

(実施例43、44) に示したヒト2番染色体断片(以後W23断片)を保持するキメラマウス子孫(以後F1(chimera x MCH))の遺伝的背景は、TT2F細胞(実施例39)由来のCBAマウス系統及びC57BL/6マウス系統、そしてキメラマウスとの交配に用いたMCH(ICR)マウス系統の混合したものである。できるだけ均質な遺伝的背景のもとでW23断片の挙動を観察するため、まずMCH(ICR)との戻し交配を行った。F1(chimera x MCH) (任意に選んだ雄8匹、雌6匹を使用)  $\times$  MCH(ICR)の交配の結果得られた子マウスにつき(実施例43)の方法に従って、W23断片保持を検討した。その結果雄経路で8% (324匹中25匹がポジティブ)、雌経路で22% (148匹中32匹がポジティブ)の子孫にW23断片が伝達することが確認された。ここで得られたF2(F1 x MCH) (任意に選んだ雄8匹、雌8匹を使用)をさらにMCH(ICR)と交配した際の伝達率は雄経路9% (346匹中30匹がポジティブ)、雌経路24% (202匹中48匹がポジティブ)とF1(chimera x MCH)  $\times$  MCH(ICR)の結果と同様であった。この交配によりF3(F2 x MCH)が得られた。

4週令～12週令のキメラマウス（図43中：chimera、4個体）、F1(chimera x MCH)（19個体）、F2(F1 x MCH)（39個体）、F3(F2 x MCH)（33個体）について（実施例44）と同様の方法により血清中ヒト抗体κ鎖濃度を測定した結果を図43に示す。W23断片を保持する全ての個体の血清中にヒト抗体κ鎖が検出された。一方、F2(F1 x MCH)及びF3(F2 x MCH)においてはκ鎖濃度のばらつきが大きくなり、その平均値がchimera及びF1(chimera x MCH)と比較して低下した。

MCH(ICR)以外の系統との交配の影響を調べるため、MCH(ICR)との交配実験で使ったものと同じF2(F1 x MCH)個体をC57BL/6N（日本クレアより購入）系統と交配した。その結果得られたW23断片を保持する個体（F3(F2 x C57BL/6)）の26個体について前記と同様なκ鎖濃度測定を行ったところ、キメラマウス及びF1(chimera x MCH)と同等な高いκ鎖濃度を示した（図43）。前述した通り、F3(F2 x MCH)とF3(F2 x C57BL/6)はまったく同じF2(F1 x MCH)個体群を親とすることから、両者の違いは遺伝的背景のみと考えられる。すなわち、遺伝的背景の違いがヒト抗体κ鎖の発現量に影響を与えることが示された。そしてヒト抗体κ鎖の効率的な発現にはMCH(ICR)よりもC57BL/6の遺伝的背景がより望ましいことが明かとなった。同様な実験から、C3H HeN系統（日本クレアより購入）の遺伝的背景もC57BL/6と同等かそれ以上にヒト抗体κ鎖の効率的な発現に望ましいことも示された。

ここで観察された遺伝的背景の抗体κ鎖濃度への影響が、個体レベルでの染色体保持率（安定性）と関係しているかについて以下の実験を行い検討した。F1(chimera x MCH)個体のうち2F-1（血清中κ鎖濃度：84mg/l）、1F-3（血清中κ鎖濃度：13mg/l）の尻尾由来繊維芽細胞及び骨髓細胞から調製した中期染色体サンプルについてFISH解析（Tomizukaら, Nature Genetics, 16, 133-143）を行い、観察した中期分裂像のうちヒト染色体特異的プローブとハイブリダイズするW23断片を含むものの割合を検定した。ここで得られる値は繊維芽細胞及び骨髓細胞におけるW23断片の保持率を示していると考えられる。その結果、2F-1においては繊維芽細胞：51%、骨髓細胞：34%、1F-3においては繊維芽細胞：23%、骨髓細胞：18%という保持率であった（それぞれ50個以上の核板を測定）。これらの結果より、血清中κ鎖濃度と繊維芽細胞、骨髓細胞におけるW23断片保持率の間



には相関があることが示唆された。すなわち、遺伝的背景は、導入したヒト染色体断片そのものの安定性に影響を与えている可能性が高く、C57BL/6及びC3H系統の遺伝的背景はここ示した2番染色体断片だけでなく他の染色体断片（例えば14番染色体断片）上の遺伝子の効率的発現にも望ましいものと考えられる。

この推察を検証するために（実施例68）で得られたヒト14番染色体断片（以後SC20断片）を保持し、ヒト抗体重鎖を血清中に発現するF1(chimera x MCH)雄個体#17-7とMCH(ICR)及びC57BL/6との交配を行った。得られた子孫のうちSC20断片を保持するF2(F1 x MCH)：2個体、F2(F1 x C57BL/6)：2個体について血清中ヒト鎖濃度（実施例68）及び尻尾由来繊維芽細胞より調製した中期染色体サンプルにおけるSC20断片保持率をW23断片の場合と同様に測定した。その結果、F2(F1 x MCH)の $\mu$ 鎖濃度：11.0mg/l, 1.1mg/l、染色体保持率：74%, 54%に対してF2(F1 x C57BL/6)の場合ヒト $\mu$ 鎖濃度：47mg/l, 54mg/l、染色体保持率：84%, 88%であり、ヒト $\mu$ 鎖濃度、染色体保持率共にF2(F1 x C57BL/6)個体の方が高い値を示した。すなわち、W23断片を保持するマウスを用いた結果より推察された通り、C57BL/6の遺伝的背景は導入ヒト染色体の安定保持及び当該染色体上の遺伝子の効率的発現に望ましいことが明らかとなった。

（実施例80）抗体重鎖欠損かつ抗体 $\kappa$ 鎖相同組換え体ES細胞株からのキメラマウス作成

（実施例58）で得られた抗体重鎖欠損かつ抗体 $\kappa$ 鎖相同組換え体ES細胞株HD43を凍結ストックより立ち上げ、ICR（日本クレア社）雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10～12個注入した。ES細胞用培地（実施例9）で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス（日本クレア社）の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。

計314個の注入胚を移植した結果、51匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚（ICR）由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかにより判定される。誕生した51匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は26匹であった。うち2個体は毛色の100%が野生色の（ES細胞に由来する）雌キメラマウスであった。

この結果より、抗体重鎖欠損かつ抗体軽鎖鎖相同組換え体ES細胞株HD43はキメラ形成能を保持していることが確認された。得られたキメラマウスのうち100%の貢献率を示す雌においては、ES細胞が機能的な生殖細胞（卵子）に分化している可能性が高い。

雌キメラマウス（毛色のキメラ率100%）について雄ICRマウスとの交配によりES細胞由来の子孫が誕生するかを検討した。この交配においてICR雄マウス（アルビノ、劣性）由来精子により受精したキメラマウス中のTT2F細胞（野生色：優性）由来の卵子からは野生色、ICR由来卵子からは白色の子マウスが誕生する。それぞれ1回の交配によって得られた生存可能な子マウスのすべてがES細胞由来の毛色である野生色を示した。これらの子マウスの尻尾より調製したゲノムDNAについて抗体 $\kappa$ 鎖破壊アレルの存在をサザン解析により検討した（実施例58）。その結果抗体 $\kappa$ 鎖破壊アレルを持つ個体を得られた。

抗体軽鎖欠損ヘテロ接合体の雌雄個体の交配により生まれた27匹の子マウスについてサザン解析（実施例58）を行った。その結果7匹において抗体軽鎖野生型アレルが消失し、欠損アレルのみ観察されたことから、これらの個体は抗体軽鎖欠損ホモ個体であると考えられた。また、血清中におけるマウス抗体 $\kappa$ 鎖および $\lambda$ 鎖の検出、定量を行った結果を図44に示す。

サザン解析の結果抗体 $\kappa$ 鎖欠損ホモと判定された個体（図中4, 6, 14, 22, 24, 25, 26）においては $\kappa$ 鎖の濃度が大きく減少し（残存している $\kappa$ 鎖は母親由来と考えられる）、代わりに $\lambda$ 鎖の濃度が大きく上昇している。これらの結果はこれまでに報告された抗体 $\kappa$ 鎖ノックアウトマウスの解析結果（Yong-Rui Zouら, EMBO J. 12, 811-820 (1993)）と一致している。

すなわち、抗体 $\kappa$ 鎖相同組換え体ES細胞株HD43より、抗体 $\kappa$ 鎖ノックアウトマウス系統を確立することができた。

（実施例81）ヒト22番染色体上にヒトテロメア配列を挿入するためのターゲティングベクターの作製

ヒト抗体軽鎖 $\lambda$ 遺伝子（以下Ig $\lambda$ 遺伝子と記す）が存在する22番染色体上に相同組み換えによりヒトテロメア配列を挿入し、断片化（J. E. Itzhakiら, Natu

re Genet., 2, 283-287, 1992) することを試みた。具体的には、Igλ遺伝子の極近傍（テロメア側）に存在するLIF遺伝子座にヒトテロメア配列を挿入するためのターゲティングベクターを作製した。

ヒトテロメア配列は、J. J. Harringtonら (Nature Genet., 15, 345-355, 1997) にならって、PCRにより合成した。PCR産物をアガロースゲル電気泳動により精製し、DNA blunting Kit (宝酒造) を用いて平滑化した。この平滑化PCR産物をpBluescript SK II(+) (東洋紡) のEco RV部位にライゲーション (DNA Ligation Kit, 宝酒造) により挿入した (pBS-TEL)。このプラスミドpBS-TELのシーケンスを行った結果、Hin dIII - (TTAGGG)<sub>n</sub> - Eco RI の方向で挿入されていた。

次に、相同組み換えに用いるヒト22番染色体上のLIF遺伝子領域を以下のようにして、PCRで増幅し、プラスミドpBS-TELにクローニングした。PCRに用いたプライマーのシーケンスは以下のである。

センスプライマー ; 5'-TCGAACTAGTAGGAGAAGTGAAGTTGAGGAGGC-3' (配列番号65)

アンチセンスプライマー ; 5'-TCGAACTAGTGATTTCAGTGATGCTGTGCAGG-3' (配列番号66)

PCR反応液の組成は、10 X LA PCR buffer II (Mg<sup>2+</sup> free) (宝酒造) 5 μl、25mM MgCl<sub>2</sub> 5 μl、dNTPmixture (2.5mM each) (宝酒造) 8 μl、センスプライマー10pmol、アンチセンスプライマー10pmol、テンプレートDNA (HFL1, ヒト初代繊維芽細胞ゲノム) 100ng、LA Taq (5u/μl) (宝酒造) 0.5 μl で、滅菌蒸留水を足して全量50 μlにした。反応液の調製は全て氷上で行い、予め85℃にセットしてあるサーマルサイクラー (PCR system 9600, パーキンエルマー) のウェルに反応チューブをセットした。94℃で1分加熱後、98℃, 10秒、65℃, 5分のサイクルを35回行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動により精製し、Spe Iで切断し (プライマー中にSpe I 部位が存在)、pBS-TELのSpe I 部位に挿入した。

LIF遺伝子の方向がヒトテロメア配列(TTAGGG)<sub>n</sub>に対して逆方向に挿入されているものを選択した (M. Giovannini ら、Cytogenet Cell Genet 64, 240-244, 1993) [pBS-TEL/LIF]。

次に、~~ピューロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpGKPuro (S. Watanabe~~  
ら、Biochem. Biophys. Res. Comm., 213, 130-137, 1995) をEco RIで切断後、

平滑化し、Not I リンカーを挿入した。Not I 切断によりピューロマイシン耐性遺伝子を切り出し、pBS-TEL/LIFのNot I 部位に挿入した。ピューロマイシン耐性遺伝子の転写方向がLIF遺伝子の方向と同じものを選択した（pBS-TEL/LIFPu ro、図45）。このプラスミドは大腸菌DH5を用いて増幅し、QIAGENカラム（フナコシ）により精製し、トランスフェクションに用いた（後記）。

#### （実施例82）ヒト22番染色体のトリDT40細胞への導入

G418耐性遺伝子でマーキングされたヒト22番染色体を有するマウスA9細胞（富塚ら、Nature Genet. 16, 133-143, 1997、以下A9/#22neoと記す）の培養は、10%ウシ胎児血清（以下FBSで記す）とG418（800  $\mu$ g/ml）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（以下DMEMと記す）中で行った。トリDT40細胞の培養は、10% FBS、1%ニワトリ血清、 $10^{-4}$ M 2-メルカプトエタノールを添加したDMEM中で行った。

ミクロセルは以下のようにして得た（詳細は、清水ら、細胞工学ハンドブック、羊土社、p127-）。A9/#22neo細胞を12本の25cm<sup>2</sup>遠心用フラスコ（コースター、3025）にて、細胞密度が90%飽和程度まで培養した。コルセミド（0.07  $\mu$ g/ml、デメコルシン、和光純薬）を添加した培地（DMEM + 20%FBS）に交換し、さらに2.5-3日間培養し、ミクロセルを形成させた。培養液を除去し、予め37℃で保温したサイトカラシンB（10  $\mu$ g/ml、シグマ）溶液を遠心用フラスコに満たし、34℃、8000rpm、1時間の遠心を行った。ミクロセルをDMEMに懸濁し、フィルターろ過により精製した。精製後、1500rpmで10分間遠心し、DMEM5mlに懸濁した。2 x 10<sup>7</sup>個のDT40を1000rpm、5分間遠心し、DMEMで2回洗浄し、DMEM5mlに懸濁した。再度、ミクロセルを1500rpmで10分間遠心し、上清を除かずに、先のDT40懸濁液5mlを静かに重層した。1300rpm、5分間の遠心後、上清を除去し、PHA-P（100  $\mu$ g/ml、ダフコ）2mlに懸濁し、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中に15分間静置した。1700rpm、7分間遠心し、上清を除去し、細胞塊をタッピングでほぐした。PEG1500（ポリエチレングリコール、ベーリンガー）1mlを静かに加え、攪拌しながら1.5-2分間処理した。処理後、DMEM1mlを約1分間かけて加え、さらにDMEM3mlを約2分間かけて加え、さらにDMEMを足して全量11mlにし、

攪拌した。室温で10分間静置した後、1300rpm, 5分間遠心し、上清を除去して上記培液10mlに懸濁し、直径100mmディッシュ中で24時間培養した。24時間後、G418 (1mg/ml) を添加した培地に交換し、24穴プレート (住友ベークライト) 3枚に分注し、約2週間選択培養を行い、G418耐性クローンを単離した。

#### (1) PCR解析

選択培養の結果、約30個のG418耐性クローンが得られた。これらのクローンからPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System社) を用いてゲノムDNAを抽出し、これを鋳型にしてヒトIgλ遺伝子特異的プライマーを用いたPCRを行うことによって、Igλ遺伝子を含んだヒト22番染色体を有するクローンを同定した。用いたヒトIgλ遺伝子特異的プライマーは以下のようである。

5' -GAGAGTTGCAGAAGGGGTGACT-3' (配列番号67)

5' -GGAGACCACCAAACCCTCCAAA-3' (配列番号68)

PCR反応液の組成は、10 X Ex Taq buffer (宝酒造) 5 μl, dNTPmixture (2.5 mM each) (宝酒造) 8 μl, 各プライマー10pmol, ゲノムDNA100ng, Ex Taq (5u/μl) (宝酒造) 0.5 μl で、滅菌蒸留水を足して全量50 μlにした。反応液の調製は全て氷上で行い、予め85℃にセットしてあるサーマルサイクラー (PCR system 9600, パーキンエルマー) のウェルに反応チューブをセットした。94℃で1分加熱後、98℃, 10秒、56℃, 30秒、72℃, 30秒のサイクルを35回行った。この結果、ヒトIgλ遺伝子を有するクローンが2個同定された。この2クローンに対して、ヒト22番染色体上の多型マーカー (D22S315, D22S280, D22S283, D22S274, Polymorphic STS Primer Pair, BIOS社、J.E. Collinsら、Nature 377 suppl:367, 1995) の存在をPCRによって検出した (図46)。PCRの条件はヒトIgλ遺伝子の検出の条件と同じである。○はマーカーが検出されたことを、×は検出されなかったことを示す。左側は物理的地図に基づく各マーカーの22番染色体上の位置を示す。この結果から、この2クローンはヒト22番染色体のほぼ全長を持つものと考えられた。残りのクローンについては、ヒトIgλ遺伝子は検出されないが、上記の22番染色体多型マーカーの幾つかが検出された。

#### (2) FISH解析

上記2クローン中の52-18に対して、実際にヒト22番染色体が細胞中でどのよ

うに存在しているかをFISHによって解析した。染色体標本の作製、ハイブリダイゼーション、検出などの基本操作は富塚ら（Nature Genet. 16, 133-143, 1997）に従い、プローブはヒトCOT-1 DNA（ローダミン標識）を用いた。20から30の分裂像を観察した結果、PCRの結果のとおり、ヒト22番染色体のほぼ全長が独立して存在していることが確認できた（図50）。赤色に染まっているのがヒト22番染色体である。

以上の解析結果より、トリDT40細胞株52-18（以下DT40/#22neoと記す）はヒト22番染色体のほぼ全長を有すると判断した。

#### （実施例83）トリDT40細胞中でのヒト22番染色体の特異的断片化

（実施例82）で得たDT40/#22neoに対して、（実施例81）で作製したプラスミドpBS-TEL/LIFPuroをトランスフェクションし、ヒト22番染色体をLIF遺伝子座上で特異的に断片化することを試みた。

DT40/#22neo細胞の培養は、G418（1mg/ml）を添加した（実施例82）と同じ条件で行った。10<sup>7</sup>個の細胞を冷PBSで1回洗浄し、0.5mlのPBSに懸濁し、氷上に置いた。Eco RIで線状化したpBS-TEL/LIFPuro 25-30  $\mu$ gを細胞に加え、ピペットで混合し、エレクトロポレーション用のキューベット（バイオラッド）に移し、水中で10分間静置した。キューベットをジーンパルサー（バイオラッド）にセットし、550V、25  $\mu$ Fの条件で電圧印加した。水中で10分間静置後、培地（前記）を含んだ75cm<sup>2</sup>培養フラスコに細胞を移し、24時間培養した。24時間後、G418（1mg/ml）とピューロマイシン（0.3  $\mu$ g/ml、シグマ）を添加した培地に交換し、96穴培養プレート5-8枚に分注し、約2週間の選択培養を行い、耐性クローンを単離した。

##### （1）PCR解析

選択培養の結果、約80個の耐性クローンが得られた。これらの細胞から前記と同様にゲノムDNAを抽出し、PCRを行い、ヒトテロメア配列がLIF遺伝子座に挿入された相同組み換え体を同定した。プライマーの一方をベクターには含まれないLIF遺伝子領域中に設計し、もう一方のプライマーはベクターに含まれるピューロマイシン耐性遺伝子中に設計した（図47）。プライマーの配列は以下のよう

である。

Puro.1; 5'-GAGCTGCAAGAACTCTTCCTCACG-3' (配列番号69)

LIF1; 5'-ATGACTCTAAGGCAGGAACATCTGTACC-3' (配列番号70)

PCR 反応液の組成は、10 X LA PCR buffer II (Mg<sup>2+</sup> free) (宝酒造) 5  $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ l, dNTPmixture(2.5mM each) (宝酒造) 8  $\mu$ l, 各プライマー 10pmol, テンプレートDNA 100ng, LA Taq (5u/ $\mu$ l) (宝酒造) 0.5  $\mu$ l で、滅菌蒸留水を足して全量50 $\mu$ lにした。反応液の調製は全て氷上で行い、予め85℃にセットしてあるサーマルサイクラー (PCR system 9600, パーキンエルマー) のウェルに反応チューブをセットした。94℃で1分加熱後、98℃, 10秒、65℃, 10分のサイクルを35回行った。目的の相同組み換え体においてのみ、図47に示した様な6.3kbのPCR産物が検出されるはずである。PCRの結果、8クローンにおいてこの6.3kbのバンドが検出された (相同組み換え率; 約10%)。このPCR産物をSal Iで切断した結果、予想通りの切断パターンが得られ、相同組み換え体であることが確認された。

次に、これら8クローンにおいて、期待通りの断片化が起きているか否かを22番染色体上の遺伝子 (Ig $\lambda$ , LIF, MB, IL2RB, CYP2D6, DIA1, ECGF1, ARSA, J.E. Collinsら、Nature 377 suppl:367, 1995) 及び多型マーカー (D22S315, D22S275, D22S280, D22S281, D22S277, D22S278, D22S283, D22S272, D22S282, D22S274, J.E. Collinsら、Nature 377 suppl:367, 1995) の存在をPCRで検出することによって調べた。

用いたプライマー配列の一部は以下のようなものである。残りのプライマー配列に関しては富塚ら (Nature Genet. 16, 133-143, 1997) が用いたものと同じである。LIFについては、上記実験より存在していることは明らかである。

CYP2D6

センスプライマー; 5'-CTGCGTGTGTAATCGTGTCC-3' (配列番号71)

アンチセンスプライマー; 5'-TCTGCTGTGAGTGAACCTGC-3' (配列番号72)

ECGF1

センスプライマー; 5'-AGGAGGCACCTTGGATAAGC-3' (配列番号73)

アンチセンスプライマー; 5'-TCACTCTGACCCACGATACAGC-3' (配列番号74)

PCR反応液の組成は、10 X Ex Taq buffer (宝酒造) 5  $\mu$ l, dNTPmixture (2.5 mM each) (宝酒造) 8  $\mu$ l, 各プライマー10pmol, ゲノムDNA100ng, Ex Taq (5u/ $\mu$ l) (宝酒造) 0.5  $\mu$ l で、滅菌蒸留水を足して全量50  $\mu$ lにした。反応液の調製は全て氷上で行い、予め85℃にセットしてあるサーマルサイクラー (PCR system 9600, パーキンエルマー) のウェルに反応チューブをセットした。94℃で1分加熱後、98℃, 10秒、56℃ (CYP2D6とECGF1は65℃), 30秒、72℃, 30秒のサイクルを35回行った。結果を図48に示した。○、×の表記は前記と同じである。この図から明らかなように、クローン67, 68, 328, 343について、ヒトテロメア配列が挿入されているLIF遺伝子座よりテロメア側の遺伝子及びマーカーは全て検出されていないことが分かる。少なくともこの4クローンに関しては、予想通りのテロメア配列による断片化が起きていることが考えられる。

## (2) FISH解析

実際にヒト22番染色体が断片化しているか否かをFISHにより解析した。実験方法は前記と同様であり、プローブはヒトCOT1 DNA (ローダミン標識) とプラスミドpGKPURO (FITC標識) を用いた。COT1染色により、ほぼ全長のヒト22番染色体を持つDT40/#22neoと比較して断片化しているかが視覚的に判断できる。また、予想通りベクターが挿入されたLIF遺伝子座で断片化していれば、Puroプローブ由来のシグナルを22番染色体断片のテロメア一端に認めることができるはずである。結果の一部を図49に示した。全てのクローンにおいて、20から30の分裂像を観察した結果、驚くべきことに相同組み換え体8クロンの全てにおいて、Puroプローブ由来のシグナル (黄緑色) をテロメア一端に持つヒト22番染色体の小断片 (赤色) が観察された。上記のPCR解析の結果、断片化が起きていないと推察されたクローン (64, 212, 222, 305) に関しては、ほぼ全長のヒト22番染色体を持つ細胞が全細胞の約10%位混在していた。

以上の実験結果より、とりDT40/#22 neo細胞において、LIF遺伝子座にヒトテロメア配列が挿入された相同組み換え体が約10%の効率で得られ、その全てのクローンにおいて (効率100%)、その挿入部位でヒト22番染色体の小断片化が起きていることが分かった。



(実施例84) ヒト14番染色体部分断片及びヒト22番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、軽鎖欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に移入して作製したキメラマウスからの完全ヒト抗体産生ハイブリドーマの取得

(1) 抗TNF- $\alpha$  ヒトIgM抗体の取得

(実施例67-(3)) で作製されたキメラマウスCLH13-7 (TT2FESクローンLH13由来、キメラ率50%) に対して、ヒトTNF- $\alpha$ による免疫を行いハイブリドーマを作製した。PBSに溶解したヒトTumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ 、PEPRO TECH EC LTD.、300-01A) とアジュバント (MPL+TDM Emulsion, RIBI Immunochem Research Inc.、R-700) とを混合して0.025mg/mlの TNF- $\alpha$  溶液を調整し、その0.2mlを腹腔に免疫した。70日間にわたって1あるいは2週間間隔で免疫し、最終免疫の2週間後にPBSに溶解した0.025mg/mlのTNF- $\alpha$  を0.2ml免疫した。最終免疫の3日後に、キメラマウスから臓器を取り出し、(実施例24) に従いPEGにて細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。融合後の細胞を、細胞数が25万個/mlとなるよう、1mg/mlのG418、2%牛胎児血清、HCF (エア・ブラウン) 5%を添加した培地 (三光純薬、ニス・クローンクローニングメデュームCM-B) に希釈し、各wellに100 $\mu$ lずつ96穴プレート分注し培養した。培養14日目には約40%のwellにコロニーが生じた。培養上清を(実施例14) に従いELISA法によって解析し、ヒト抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。TNF- $\alpha$  を炭酸緩衝液 (シグマ、C-3041) で0.5 $\mu$ g/mlに希釈し96穴プレート (NUNC、442404) に50 $\mu$ lずつ分注しコーティングした。ビオチン標識抗ヒト免疫グロブリン $\lambda$  鎖抗体 (Vector、BA-3070) とABCキット (Vector、PK4000) を用いてTMBZ (DAKO、S1599) により検出した。陰性対照の約2倍以上の吸光度を目安にして判定した。陽性ウェルの細胞を96穴プレートに移し、IMDMに1mg/mlのG418と10%FBSとを添加した培地を用いて培養した。培養上清をELISAで解析した。TNF- $\alpha$  を炭酸緩衝液で0.5 $\mu$ g/mlに希釈し96穴プレートに50 $\mu$ lずつ分注しコーティングした。ペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\mu$  鎖抗体 (Biosorce、AH10604) を用いてTMBZにより検出した。陰性対照の約2倍以上の吸光度を目安にして判定し、陽性ウェルのうち発色の強い2個のウェルの細胞を(実施例66) と同様に限界希釈法でクローニングし、TNF- $\alpha$  に結合しヒトIg $\mu$  とIg $\lambda$  を持つ完全ヒト抗体を

生産するハイブリドーマを得た。

(2) 抗TNF- $\alpha$  ヒトIgM抗体の取得

(実施例67-(3)) で作製されたキメラマウスCLH13-13 (TT2FESクローンLH13由来、キメラ率50%) に対して、ヒトTNF- $\alpha$ による免疫を行いハイブリドーマを作製した。PBSに溶解したヒトTumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ 、PEPRO TECH EC LTD.、300-01A) とアジュバント (MPL+TDM Emulsion, RIBI Immunochem Research Inc.) とを混合して0.025mg/mlの TNF- $\alpha$  溶液を調整し、その0.2mlを腹腔に5回にわたって毎週免疫した。5回目の免疫の2週間後にTNF- $\alpha$  溶液を免疫してブーストした。さらにブーストの2週間後にPBSに溶解した0.025mg/mlのTNF- $\alpha$  を免疫した。毎週採血し、血清中の抗TNF- $\alpha$  ヒトIg $\gamma$  濃度を(実施例14) に従いELISA法で検出した。図50に示すようにTNF- $\alpha$  に対するヒトIg $\gamma$  抗体価が上昇した。最終免疫の3日後に、キメラマウスから脾臓を取り出し、(実施例24) に従いPEGにて細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。融合後の細胞を、細胞数が25万個/mlとなるよう、1mg/mlのG418、2%牛胎児血清、HCF (エア・ブラウン) 5%を添加した培地 (三光純薬、エス・クロンクローニングメデュームCM-B) に希釈し、各wellに50 $\mu$ lずつ96穴プレート分注し培養した。培養14日目には約60%のwellにコロニーが生じた。培養上清を(実施例14) に従いELISA法によってヒト抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。TNF- $\alpha$  を炭酸緩衝液で0.5 $\mu$ g/mlに希釈し96穴プレートに50 $\mu$ lずつ分注しコーティングした。ペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\gamma$  鎖抗体 (シグマ、A-0170) を用いてTMBZにより検出した。陰性対照の約2倍以上の吸光度を目安にして判定した。陽性ウエルの細胞を96穴プレートに移し、IMDMに10%FBSと1mg/mlのG418とを添加した培地を用いて培養した。培養上清をELISAで解析した。TNF- $\alpha$  を炭酸緩衝液で0.5 $\mu$ g/mlに希釈し96穴プレートに100 $\mu$ lずつ分注しコーティングした。ペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン $\lambda$  鎖抗体 (Southern Biotechnology Associates Inc.、2070-05) を用いてTMBZにより検出した。陰性対照の約2倍以上の吸光度を目安にして判定し、2個のウエルでヒトIg $\gamma$  とIg $\lambda$  を持つ完全ヒト抗体の存在が確認された。

この結果よりヒト14番染色体部分断片及びヒト22番染色体部分断片を保持する内

在性抗体重鎖、軽鎖欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に移入して作製したキメラマウスにおいてTNF- $\alpha$ 抗原刺激に対して、抗原特異的ヒトIg $\gamma$ の抗体価上昇が起こることが確認された。またこれらのキメラマウスからTNF- $\alpha$ に特異的な完全ヒト抗体IgMあるいはIgGを生産するハイブリドーマが得られることが確認された。

### (3) 糖鎖抗原に対するヒトIgM抗体の取得

(実施例67-(3)) で作製されたキメラマウスCLH13-10 (TT2FESクローンLH13由来、キメラ率60%) およびCLH13-18 (TT2FESクローンLH13由来、キメラ率30%) に対して、ガングリオシドによる免疫を行った。アジュバント (MPL+TDM Emulsion, RIBI Immunochem Research Inc., R-700) を2mlのクロロホルム・メタノール (2:1) に溶解した。そのそれぞれ1ml を、1mlのクロロホルム・メタノール (2:1) に溶解した1mgのGM2 (シグマ、G8397) あるいは1mg のASIALO-GM1 (ISOSEP AB、65/12) と混合した。混合溶液をナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレータにて乾燥させた。PBSをそれぞれ1ml添加した後Vortexミキサーを用いて激しく攪拌し、懸濁液を調製した。GM2とASIALO-GM1とを含んだ懸濁液を等量混合し、その0.2mlを毎週3回キメラマウスCLH13-18には腹腔に、キメラマウスCLH13-10には皮下にそれぞれ免疫した。毎週採血し、ELISAを(実施例14)の方法に従って行い、抗体価の上昇を確認した。ガングリオシドGM2あるいはASIALO-GM1をエタノールに溶解して6 $\mu$ g/mlとし、50 $\mu$ lずつELISAプレートに分注した。2時間室温にて放置し、乾燥させた。ガングリオシドを含まないエタノールのみをプレートに添加し対照とした。2%牛血清アルブミン (BSA、オリエンタル酵母) を添加したPBSを200 $\mu$ l/well添加し室温で3時間ブロッキングした。洗浄後4%牛胎児血清 (FBS) を添加したPBSで、100倍に希釈したキメラマウス血清を50 $\mu$ l/well添加し4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。洗浄後0.1%BSA添加のPBSで希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgM抗体 (Biosorce、AH10604) を50 $\mu$ l/well添加し3時間室温で放置した。TMBを添加し15分反応させた後、1Nの硫酸を添加して反応を停止させた。450nmにおける吸光度を測定し、対照としたウェルの吸光度を減じて抗体価の上昇を求めた。キメラマウスCLH13-18血清中の抗アシアロGM1ヒトIg $\mu$ の結果を図51に、キメラマウスCLH13-10血清中の抗

GM2ヒトIgMの結果を図52にそれぞれ示す。図に示すように、ガングリオシドを免疫することによって、抗原に特異的なヒトIgM抗体価の上昇が確認された。すなわち、本発明のヒト抗体生産キメラマウスにおいて糖鎖抗原に対する免疫応答が確認された。

3回目の免疫の3週間後に再度免疫しブーストした。最終免疫の3日後に、キメラマウスから脾臓を取り出し、(実施例24)に従いPEGにて細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。

このようにして得られるガングリオシドGM2あるいはASIALO-GM1に対するヒト抗体はHIVの治療やメラノーマなどのガンの治療に有用と考えられる。

(実施例85) 完全なヒト抗体を主として産生するマウス系統の交配による作製(B)

(実施例73)に示された方法で作成された「SC20断片保持、重鎖欠損ホモあるいはヘテロ、 $\kappa$ 鎖欠損ホモまたはヘテロ」である雄あるいは雌個体と、(実施例73)に示された方法で作成された「W23断片保持、重鎖欠損ホモあるいはヘテロ、 $\kappa$ 鎖欠損ホモまたはヘテロ」である雄あるいは雌個体の間の交配を行った。この交配により、SC20断片を保持し、W23断片を保持し、重鎖欠損についてホモであり、 $\kappa$ 鎖欠損についてホモであるという4つの条件を満たすマウス個体(ダブルTc/KO)が得られることが期待される。

(1) シングルTc/KOマウスの解析

まず、上記の交配により誕生した計189匹のマウスについて、以下の4種(A)～(D)の解析を行い、上記、の条件のみを満たす(W23断片を保持せず、 $\kappa$ 欠損についてはヘテロあるいは野生型である)個体(シングルTc/KO)の検索を行った。これらの個体においては欠損しているマウス重鎖の代わりに導入したヒト重鎖の働きによってによりBリンパ球が発生する。また、血清中の抗体分子は大部分がヒト重鎖を含むと考えられる。

(A) SC20断片保持検討のため、各個体より調製したDNAについて(実施例68-(4))と同様な方法でPCR解析を行った。使用したプライマーはSC20断片特異的なD14S543である。

(B) 内因性重鎖欠損の状態を検討するため、(実施例49)と同様にサザン解析を行った。

(C) W23断片保持検討のため、各個体より調製したDNAについて(実施例1)と同様な方法でPCRを行った。使用したプライマーはW23断片特異的なD2S1331 (Tomizukaら, Nature Genetics, 1997, 前記)である。

(D) 内因性 $\kappa$ 鎖欠損の状態を検討するため、(実施例58)と同様にサザン解析を行った。

これらの解析により189匹中20匹がシングルTc/KO個体であると判定された。

シングルTc/KO個体HK83(5ヶ月令)より50 $\mu$ lの血液を採取し、凝固防止のため2 $\mu$ lの0.5M EDTA (pH. 8.0)を加えた。この血液サンプルを遠心用チューブに移した後、400 $\mu$ lの滅菌水を加え、30秒後にさらに10%牛胎児血清(FCS)を含む2 $\times$ 濃度のPBSを加え、SEROMATIC-2 (KA2200、クボタ社製)にて遠心した。遠心後上清を除き、わずかに残った液に沈殿を懸濁しStaining Medium (SM: 1mM EDTA, 5% FCS, 0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS)を加えて再度遠心を行った。上清を取り除いた後に残る10 $\mu$ l程度のSMに沈殿を懸濁し、1 $\mu$ lのFc-block (PharMingen, 01241A, anti-mouse CD32/CD16)を加えて1時間氷上で静置した。1時間経過後、さらにPE標識されたanti-mouse CD45R/B220 (PharMingen, 01125A)及びFITC標識されたanti-human IgM (PharMingen, 08074D)を各1 $\mu$ lずつ加え、さらに1時間静置した。染色された細胞をこの後、SMにより前記のように2回洗浄し、最終的に200 $\mu$ lのSMに懸濁して末梢血有核細胞染色サンプルとした。フローサイトメトリーによる解析はFACS-vantage (Becton Dickinson社製)を使用して行った。その結果を(図53)に示す。マウス抗体重鎖欠損(KO)個体(図中 $\Delta H/\Delta H$ )においてはB220陽性細胞すなわちBリンパ球が存在しないが、シングルTc/KO個体(図中 $\Delta H/\Delta H$ , SC20)においてはB220、ヒト $\mu$ 鎖(図中h $\mu$ )の両者が陽性のBリンパ球の細胞集団の存在が確認された。すなわち、シングルTc/KO個体においてはSC20断片の導入によりBリンパ球の欠損が救済されたことが示された。

シングルTc/KOマウス8個体、HK7(18週令)、HK38(13週令)、HK45(13週令)、HK47(13週令)、HK50(13週令)、HK61(13週令)、HK78(17週令)、HK

83(17週令)より採血し、血清中ヒト $\mu$ 鎖濃度、ヒト $\gamma$ 鎖濃度を(実施例14)と同様にELISA法により測定した。また、対照として抗体重鎖欠損ヘテロであり、抗体 $\kappa$ 鎖欠損についてヘテロあるいは野生型である(ヒト染色体断片を含まない)4個体(シングルTc/KOと同腹の子であり、13~18週令である)より取得した血清についてマウス $\mu$ 鎖を(実施例75)に示した方法で、マウス $\gamma$ 鎖を以下に示す方法により検出した。マウス $\gamma$ 鎖濃度は(実施例14)に従いELISA法で決定した。PBSで希釈した抗マウス免疫グロブリン $\gamma$ 鎖抗体(シグマ、I4280)を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、牛胎児血清(FBS)を加えたPBSで希釈した血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン $\gamma$ 鎖抗体(Caltag、M30107)を加えてインキュベートした。プレートを洗浄し、ペルオキシダーゼ基質としてTMBZ(住友ベークライト、ML-1120T)の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価し、精製された濃度既知の $\gamma$ 鎖を持つマウスイムノグロブリンIgG(Pharmingen、03171D)をFBSを添加したPBSで段階的に希釈したものと比較し血清中のマウス免疫グロブリン濃度を求めた。その結果を(図54)に示す。図中には各Igについて測定値の平均値も示した。シングルTc/KO個体のヒト $\mu$ 鎖平均濃度は抗体重鎖欠損ヘテロ個体のマウス $\mu$ 鎖平均濃度を上回った。シングルTc/KO個体についても前記と同様にマウス $\mu$ 鎖、マウス $\gamma$ 鎖濃度を測定した結果、全てのシングルTc/KO個体においてマウス $\mu$ 鎖は検出されず(1 $\mu$ g/ml以下)、マウス $\gamma$ 鎖濃度の平均値はヒト $\gamma$ 鎖濃度の1/10程度であった。すなわち、シングルTc/KO個体の血清中においては大部分の抗体分子がヒト重鎖を含むと考えられた。

前記のシングルTc/KOマウス7個体のうち4個体の血清サンプルについて(実施例29)と同様に血清中ヒト $\gamma$ 鎖サブクラス濃度をELISA法により測定した。その結果を(図55)に示す。全てのシングルTc/KO個体において4種のh $\gamma$ サブクラスが検出された。

2個体のシングルTc/KO個体HK45(5ヶ月令)、HK108(3.5ヶ月令)について、PBSに0.25mg/mlの濃度で溶解したヒト血清アルブミン(HSA、シグマ、A3782)0.5mlを0.5mlのアジュバント(TiterMaxGold、Cytex corporation、G-1)と混合しその0.1mlを皮下免疫した。免疫0日目、8日目、15日目のこれら

のマウスより採血し、血清中の抗HSA-ヒト $\gamma$ 鎖抗体価を（実施例21）と同様にELISA法により測定した。HSAで免疫したシングルTc/KOマウスの両個体の免疫後15日目血清において抗HSA-ヒト $\gamma$ 鎖抗体価の有意な上昇が観察された。すなわち、シングルTc/KOマウスにおいては免疫したヒト由来蛋白質に対する抗原特異的抗体（この場合ヒト $\gamma$ 鎖とマウス $\kappa$ 鎖あるいはマウス $\lambda$ 鎖からなる）が産生されることが示された。

### （2）ダブルTcマウスの解析

誕生した計189匹のマウスについて、以下の4種（A）～（D）の解析を行い、少なくとも、の条件を満たし、ヒト重鎖とヒト $\kappa$ 鎖を同時に発現するマウス個体（ダブルTc）の検索を行った。

（A）SC20断片保持検討のため、各個体より調製したDNAについて（実施例68-（4））と同様な方法でPCR解析を行った。使用したプライマーはSC20断片特異的なD14S543である。

（B）W23断片保持検討のため、各個体より調製したDNAについて（実施例68-（4））と同様な方法でPCR解析を行った。使用したプライマーはW23断片特異的なD2S1331（Tomizukaら, Nature Genetics, 1997, 前記）である。

（C）ヒト $\mu$ 鎖発現確認のため、3～6週令の各個体より採血し（実施例68-（4））に示した方法でELISA解析を行った。

（D）ヒト $\kappa$ 鎖発現確認のため、3～6週令の各個体より採血し（実施例20）に示した方法でELISA解析を行った。

これらの解析により189匹中20匹が4種全ての解析で陽性であり、ダブルTc個体であると判定された。すなわち、SC20断片、W23断片はマウス個体において同時に保持され、かつ同時に機能発現することが確認された。

### （3）ダブルTc/KOマウスの解析

20個体のダブルTcマウスのDNAについて（実施例49）及び（実施例58）と同様にサザン解析を行い、マウス重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損の状態を解析した。その結果、6個体が抗体重鎖欠損ホモかつ $\kappa$ 鎖欠損ホモであり、ダブルTc/KOマウスと判定された。

2個体のダブルTc/KOマウスHKD5（9週令）、HK190（6週令）より（実施例

85-(1))と同様な方法で調製した末梢血有核細胞についてフローサイトメトリーによる解析を(実施例85-(1))と同様に行った。その結果、両個体においてB220陽性かつ $\text{h}\mu$ 陽性であるBリンパ球細胞の存在が確認された。

3個体のダブルTc/KOマウスHK77(17週令)、HKD4(6週令)、HKD5(6週令)より採血し、血清中ヒト $\mu$ 鎖濃度、ヒト $\gamma$ 鎖濃度を(実施例14)と同様にELISA法により測定した。その結果この3個体のヒト $\mu$ 鎖血清中濃度の平均値、ヒト $\gamma$ 鎖血清中濃度の平均値はそれぞれ360mg/l、201mg/lであった。ヒト $\mu$ 鎖濃度、ヒト $\gamma$ 鎖濃度共に(図54)に示したシングルTc/KOマウスのものとはほぼ同等であった。さらに、これら3個体に加え、HK190(4週令)、HK192(4週令)について血清中ヒト $\kappa$ 鎖濃度を(実施例20)と同様に、マウス $\lambda$ 鎖濃度を以下に示す方法で検出した。マウス $\lambda$ 鎖濃度を(実施例14)に従いELISA法で検出した。PBSで希釈した抗マウス免疫グロブリン $\lambda$ 鎖抗体(Caltag、M33600)を96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、牛胎児血清(FBS)を加えたPBSで希釈した血清試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン $\lambda$ 鎖抗体(Caltag、M33607)を加えてインキュベートした。プレートを洗浄し、ペルオキシダーゼ基質としてTMBZ(住友ベークライト、ML-1120T)の添加により酵素活性を450nmの吸光度で評価し、精製された濃度既知の $\lambda$ 鎖を持つIgG(シグマ、M6034)をFBSを添加したPBSで段階的に希釈したものと比較し血清中のマウス免疫グロブリン $\lambda$ 鎖濃度を求めた。測定結果をもとにまず各個体において全軽鎖濃度(ヒト $\kappa$ 鎖濃度+マウス $\lambda$ 鎖濃度)に対するヒト $\kappa$ 鎖濃度の百分率を求めた。次に5個体についてその平均値を算出した結果、60%であった。すなわち、これらダブルTc/KOマウス血清中においては、完全なヒト抗体分子(ヒト $\mu$ 鎖/ $\kappa$ 鎖あるいはヒト $\gamma$ 鎖/ $\kappa$ 鎖)がハイブリッド抗体分子(ヒト $\mu$ 鎖/マウス $\lambda$ 鎖あるいはヒト $\gamma$ 鎖/マウス $\lambda$ 鎖)よりも優位に発現していることが示された。

ダブルTc/KOマウスHKD5(6週令)より採血し、(実施例85-(1))と同様に血清中 $\text{h}\gamma$ サブクラス濃度をELISA法により測定した。その結果は、ヒト $\gamma$ 1鎖: 141mg/l、ヒト $\gamma$ 2鎖: 61mg/l、ヒト $\gamma$ 3鎖: 119mg/l、ヒト $\gamma$ 4鎖: 8.3mg/lであり、4種全てのヒト $\gamma$ 鎖サブクラスが検出された。

2個体のダブルTc/KOマウスHK77(20週令)、HKD5(10週令)について、PBS



に0.25mg/mlの濃度で溶解したヒト血清アルブミン（HSA, シグマ, A3782）0.5mlを0.5mlのアジュバント（TiterMaxGold, Cytex corporation, G-1）と混合しその0.1mlを皮下免疫した。免疫0日目、8日目、15日目のこれらのマウスより採血し、血清中の抗HSA-ヒト $\gamma$ 鎖抗体価を（実施例21）と同様に、また抗HSA-ヒト $\kappa$ 鎖抗体価を（実施例23）と同様にELISA法により測定した。その結果を（図56）、（図57）に示す。HSAで免疫したダブルTc/KOマウスの両個体の免疫後15日目血清において抗HSA-ヒト $\gamma$ 鎖抗体価及び抗HSA-ヒト $\kappa$ 鎖抗体価の有意な上昇が観察された。すなわち、ダブルTc/KOマウスにおいては免疫したヒト由来蛋白質に対する抗原特異的な完全ヒト抗体（この場合ヒト $\gamma$ 鎖と $\kappa$ 鎖からなる）が産生されることが示された。

#### (4) ダブル Tc/KO マウス ( $\lambda 1$ 変異体) の解析

ダブル Tc/KO マウス (実施例 85-(3)) においてマウス  $\lambda$  鎖遺伝子は破壊されていない。このため血清中にマウス  $\lambda$  鎖タンパク質は依然として発現しており、その濃度は全 Ig 軽鎖中の 40% 程度であった。より効率的なヒト  $\kappa$  鎖の発現のためには競合するマウス  $\lambda$  鎖遺伝子も不活性化することが望まれる。

正常マウスと比較してマウス  $\lambda$  鎖を 50 分の 1 程度しか発現しない変異体マウスが存在することが知られている (Ju ら, J. Immunol., 136:2684, 1986)。このマウス系統の遺伝子解析の結果、Ig  $\lambda 1$  鎖遺伝子定常領域に塩基置換が存在することが原因であることがわかった (Ju ら、前記)。実際ホモ接合体変異マウス (以下  $\lambda 1$  変異体と記す) 血清中においては血清中全  $\lambda$  鎖濃度の 8 割以上を占める  $\lambda 1$  鎖 (残りは  $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$  鎖) がほとんど検出されない (Ju ら、前記)。すなわち、 $\lambda 1$  変異体においてはマウス Ig  $\lambda$  鎖の主な成分である  $\lambda 1$  鎖が不活性化されていると考えられる。

$\lambda 1$  変異体を (実施例 85-(3)) に記されたダブル Tc/KO マウスと交配し、ダブル Tc/KO ( $\lambda 1$  変異体) を得ることができる。当該マウスにおいては、血清中  $\lambda$  鎖の発現が減少し、その代わりにヒト  $\kappa$  鎖の発現が増加すると考えられる。 $\lambda 1$  変異体は ICR マウス (チャールズリバー・ジャパンより購入) の集団より (Ju ら、前記) に記載された方法で分離した。分離された  $\lambda 1$  変異体をダブル Tc/KO マウスと交配し、ダブル Tc/KO ( $\lambda 1$  変異体) を得た。得られたダブル Tc/KO ( $\lambda 1$  変異体) 及びコントロールとしてダブル Tc/KO ( $\lambda 1$  変異体ヘテロあるいは野生型) における血清中ヒト  $\kappa$  鎖濃度及びマウス  $\lambda$  鎖濃度を測定した (実施例 85-(3))。測定結果をもとにまず各個体において全軽鎖濃度に対するヒト  $\kappa$  鎖濃度の百分率を求めた。次に上記 2 種のマウス系統について各 5 個体ずつその平均値を算出した結果は、ダブル Tc/KO ( $\lambda 1$  変異体) が 93%、ダブル Tc/KO ( $\lambda 1$  変異体ヘテロあるいは野生型) が 63% であった。また、各系統 5 個体の全軽鎖濃度の平均はダブル Tc/KO ( $\lambda 1$  変異体) が 558 mg/l、ダブル Tc/KO ( $\lambda 1$  変異体ヘテロあるいは野生型) が 525 mg/l であり有意な差は認められなかった。

これらの結果はダブル Tc/KO ( $\lambda 1$  変異体) においてマウス  $\lambda$  鎖の発現レベ

ルが減少し、それを補うようにヒト $\kappa$ 鎖の発現がレベルが増加したことを示している。すなわち、 $\lambda 1$ 変異体の利用はヒト $\kappa$ 鎖及びヒト重鎖から成る完全なヒト抗体分子の効率的発現を可能にすることが示された。

(実施例86)ダブルTc/K0マウスからのHSA特異的ヒト抗体産生ハイブリドーマの取得

(実施例85)においてHSA免疫により抗体価の上昇が観察されたダブルTc/K0マウス個体HKD5より抗HSAヒト抗体産生ハイブリドーマを取得した。初回免疫後30日目に最終免疫を行い、その3日後に(実施例24)に記載した方法でハイブリドーマを作製した。G418耐性コロニーの現れた約3300ウェルの上清をELISA(実施例14、61)により分析した。その結果、11ウェルがHSA特異的ヒト $\mu$ 鎖陽性、39ウェルがHSA特異的ヒト $\gamma$ 鎖陽性であった。抗HSAヒト $\gamma$ 鎖陽性の39ウェルのうち、14ウェルがヒト $\kappa$ 鎖陽性であり、他のウェルはマウス $\lambda$ 鎖陽性であった。また、両方のIg軽鎖について同時に陽性のウェルはなかった。これらの結果は、HSA特異的な完全ヒト抗体( $\gamma$ 重鎖及び $\kappa$ 軽鎖からなる)を産生するハイブリドーマがダブルTc/K0マウスより取得されたことを示している。さらに、(実施例61-(4))に従い4種のヒト $\gamma$ 鎖サブクラスを検出するELISA解析を行った結果、7ウェルが $\gamma 1$ 陽性、2ウェルが $\gamma 2$ 陽性、5ウェルが $\gamma 4$ 陽性であることが示された。代表的な3クローンのIgG/ $\kappa$ ハイブリドーマを限界希釈によりサブクロニングし、その上清を親和性測定に使用した。BIAcoreにおける表面プラズモン共鳴を用いた親和定数の測定および付属計算ソフトによる結果は $1.1 \times 10^{10}$ から $6.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ であった。すなわちHKD5より得られた抗HSAヒトIgG/ $\kappa$ 抗体はHSAに対して高い親和性を持つことが示された。

(実施例87)カセットベクターploxPHyg, ploxPbsrの作製

以下(実施例87)～(実施例103)において、ヒト抗体 $\lambda$ 軽鎖、 $\kappa$ 軽鎖遺伝子クラスターをクローニングしたヒト人工染色体 $\lambda$ -HAC、 $\kappa$ -HACの作製について述べる。さらには、作製された各HACのマウス個体への導入、HACに含まれるヒト抗体遺伝子のマウス個体における発現、HACのキメラマウス子

孫への伝達について述べる。ここに開示される HAC 導入マウス作製システムの概略を図 58、図 59 に図示した。

ヒト染色体上に Cre 組換え酵素の認識配列である loxP 配列を挿入するためのカセットベクター ploxPHyg, ploxPbsr を以下のようにして作製した。また、前述したように、期待通りの転座が起った細胞をポジティブセレクションできるように、前者のカセットベクターには PGK プロモータが、後者にはこの PGK プロモータによって転写されるべき GFP 遺伝子が含まれるように構築した。まず、ploxPHyg の作製について述べる。プラスミド pBluescript II SK(-) (東洋紡) を制限酵素 EcoRV (ベーリンガー) で切断し、脱リン酸化酵素 CIAP (仔牛小腸由来アルカリ脱リン酸化酵素、宝酒造) を用いて、50℃で 30 分間反応し、切断末端を脱リン酸化した。これに、プラスミド pBS302 (ギブコ) から制限酵素 SpeI と HindIII (ベーリンガー) で切り出して DNA Blunting kit (宝酒造) で平滑末端化した DNA 断片を、DNA Ligation kit (宝酒造) を用いてライゲーションし、コンピテントセル DH5 (東洋紡) を形質転換した (プラスミド pBS302HS)。平滑末端化、ライゲーション及び形質転換は、各キットに添付のプロトコールに従って行った。次に、このプラスミドを制限酵素 SalI (ベーリンガー) で切断、脱リン酸化し、プラスミド pGK Puro (WHITEHEAD INSTITUTE, Dr. Peter W. Laird から分与) から制限酵素 SalI と XhoI (ベーリンガー) で切り出した PGK プロモータ断片をクローニングし、プラスミド pBSPGK302HS を得た。このプラスミドを制限酵素 EcoRI と NotI (ベーリンガー) で切断し、平滑化脱リン酸化後、NotI リンカー (宝酒造) をライゲーションした (プラスミド pBSPGK302HSN)。一方、プラスミド #1-133 (京都大学医学部 武田俊一教授より分与) を制限酵素 BamHI (ベーリンガー) で切断することによってハイグロマイシン B 耐性遺伝子カセットを切り出し、末端を平滑化した。プラスミド pBSPGK302HSN を制限酵素 SalI (ベーリンガー) で切断し平滑末端後、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子カセットをクローニングした (プラスミド ploxPHyg)。

次に、ploxPbsr の作製について述べる。まず最初に、プラスミド pBluescript II SK(-) (東洋紡) の SacI 部位に上記のようにして SfiI リンカーを挿入し

た。SfiI リンカーは、以下の配列のオリゴ DNA を合成し、5' 末端をリン酸化した（合成はグライナーに委託）。

（SfiI リンカー）

5'-GGCCGC [A/T]GCGGCC-3'（配列番号 75）

このプラスミドを制限酵素 BamHI（ベーリンガー）で切断、脱リン酸化し、プラスミド pBS302（ギブコ）から制限酵素 BamHI（ベーリンガー）で切り出した DNA 断片をクローニングした（pBSSfK302B）。プラスミド pGREEN LANTERN-1（ギブコ）の ClaI 部位に上記のように SpeI リンカー（宝酒造）を挿入し、制限酵素 SpeI（ベーリンガー）で切り出した GFP 遺伝子カセット断片を、SpeI で切断後、脱リン酸化したプラスミド pBSSfK302B にクローニングした（pBSSfK302BGFP）。このプラスミドを制限酵素 XbaI（ベーリンガー）で切断・平滑末端後、プラスミド #1-134（京都大学医学部 武田俊一教授より分与）から制限酵素 BamHI（ベーリンガー）で切り出し平滑末端化した DNA 断片（ブラストサイジン S 耐性遺伝子カセット）をクローニングした（ploxPbsr）。カセットベクター ploxPHyg, ploxPbsr の構造を図 60 に示した。

（実施例 88）ターゲティングベクター pHCF2loxPHyg(F), (R) の作製

ヒト 22 番染色体上の HCF2 遺伝子座 (lgλ 領域の極セントロメア側) に loxP 配列を挿入するためのターゲティングベクター pHCF2loxPHyg(F), (R) を以下のようにして作製した。HCF2 遺伝子の転写方向がセントロメア→テロメアか、テロメア→セントロメアかが不明のため、(F), (R) の 2 方向のターゲティングベクターを作製した。まず、ヒト HCF2 遺伝子座のゲノム領域を以下のプライマーを用いて PCR により増幅した。

HCF2-F2K; 5'-TCGAGGTACCGTGAGAACAAGACAGAGAATGAGGGAGG-3'（配列番号 76）

HCF2-R2K; 5'-TCGAGGTACCTAATGCAGAGGCTCTTTGGTGTACTTGG-3'（配列番号 77）

PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは LA Taq(宝酒造)を用い、バッファーや dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94℃

1 分の熱変性後、98℃ 10 秒、68℃ 15 分を 35 サイクル行った。PCR 産物をプロテナーズ K (ギブコ) 処理した後、CHROMA SPIN-TE400 (クローンテック) でゲル濾過した。その後、制限酵素 KpnI (ベーリンガー) で切断し CHROMA SPIN-TE1000 (クローンテック) でゲル濾過した。この PCR 断片をプラスミド pBluescriptII の KpnI 部位にクローニングした (pHCF2)。次に、カセットベクター ploxPHyg から制限酵素 KpnI と NotI (ベーリンガー) で loxP を含む DNA 断片を切り出し平滑末端化後、プラスミド pHCF2 の SnaBI 部位にクローニングした。LoxP 配列の方向がクローニングした HCF2 遺伝子断片と同方向のものを (F)、逆方向のものを (R) とした [pHCF2loxPHyg(F), (R)、図 6 1、6 2]。

(実施例 89) ターゲティングベクター pRNR2loxPbsr の作製

ヒト 14 番染色体上の RNR2 遺伝子座に loxP 配列を挿入するためのターゲティングベクター pRNR2loxPbsr を以下のようにして作製した。まず、ヒト RNR2 遺伝子座のゲノム領域を以下のプライマーを用いて PCR により増幅した。  
RNR2-F10E; 5'-TCGAGAATTCAGTAGCTGGCACTATCTTTTTGGCCATC-3' (配列番号 78)  
RNR2-R10E; 5'-TCGAGAATTCGGAGAAAGAACACACAAGGACTCGGTC-3' (配列番号 79)  
PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは LA Taq (宝酒造) を用い、バッファーや dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94℃ 1 分の熱変性後、98℃ 10 秒、68℃ 15 分を 35 サイクル行った。PCR 産物をプロテナーズ K (ギブコ) 処理した後、CHROMA SPIN-TE400 (クローンテック) でゲル濾過した。その後、制限酵素 EcoRI (ベーリンガー) で切断し CHROMA SPIN-TE1000 (クローンテック) でゲル濾過した。一方、プラスミド pBluescriptII の KpnI 部位を制限酵素 KpnI (ベーリンガー) で切断後、平滑化・セルフライゲーションすることにより欠失し、さらに NotI 部位に SrfI リンカーを挿入したプラスミドベクター [pBS(K)Sr] を作製した。尚、SrfI リンカーには以下の配列のオリゴ DNA を用いた。

SrfI リンカー; 5'-GCCCCGGGC-3' (配列番号 80)

プラスミド[pBS(K)Sr]のEcoRI部位に上記のRNR2遺伝子PCR断片をクローニングすることでプラスミドpRNR2を作製した。一方、カセットベクターploxPbsrのSfiI部位にKpnIリンカー（宝酒造）を挿入し、制限酵素KpnI（ベーリンガー）でloxP配列を含むDNA断片を切り出し、プラスミドpRNR2のKpnI部位にクローニングした。RNR2遺伝子はテロメア→セントロメア方向に転写される（R.G.Wortonら、SCIENCE, 239:64-68, 1988）ことが報告されているので、クローニングしたRNR2遺伝子PCR断片の方向とloxP配列の方向とが逆向きのものをターゲティングベクターとして用いた（pRNR2loxPbsr、図63）。

（実施例90）ターゲティングベクターpYHZloxPHYgの作製

ヒト2番染色体上のcosYHZ304（シーケンス情報は慶応義塾大学医学部清水教授より入手）ゲノム領域（lgx領域の約30 kb セントロメア側に位置）にloxP配列を挿入するためのターゲティングベクターpYHZloxPHYgを以下のようにして作製した。まず、ヒトcosYHZ304ゲノム領域を以下のプライマーを用いてPCRにより増幅した。

YHZ-F2B; 5'-TCGAGGATCCGATAGAGAGATTGTCTTAAATGGGTGGG-3'（配列番号81）

YHZ-R2B; 5'-TCGAGGATCCAACAGCTGGAAGCTCATAAAAGCATAGC-3'（配列番号82）

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはLATaq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は94℃ 1分の熱変性後、98℃ 10秒、68℃ 15分を35サイクル行った。PCR産物をプロテネースK（ギブコ）処理した後、CHROMA SPIN-TE400（クローンテック）でゲル濾過した。その後、制限酵素BamHI（ベーリンガー）で切断しCHROMA SPIN-TE1000（クローンテック）でゲル濾過した。一方、プラスミドpBluescriptIIのNotI部位を制限酵素NotI（ベーリンガー）で切断後、平滑化・セルフライゲーションすることにより欠失し、さらにSacII部位にSrfIリンカーを挿入したプラスミドベクター[pBS(N)Sr]を作製した。プラスミド[pBS(N)Sr]のBamHI部位に上記のcosYHZ304ゲノム領域PCR断片をクローニ

ングすることでプラスミド pYHZ を作製した。このプラスミドを制限酵素 Tth1111(宝酒造)で切断・平滑後、NotI リンカー(宝酒造)を挿入した(pYHZN)。一方、カセットベクター ploxPHyg の KpnI 部位に NotI リンカー(宝酒造)を挿入し、制限酵素 NotI(ベーリンガー)で loxP 配列を含む DNA 断片を切り出し、プラスミド pYHZN の NotI 部位にクローニングした。cosYHZ304 のシーケンスの方向はテロメア→セントロメア方向であることが判明している(情報は慶応義塾大学医学部 清水教授より入手)、クローニングした cosYHZ304 ゲノム PCR 断片の方向と loxP 配列の方向とが逆向きのものをターゲティングベクターとして用いた(pYHZloxPHyg、図 6 4)。

#### (実施例 9 1) カセットベクター pTELPuro の作製

ヒト染色体上にヒトテロメア配列を挿入するためのカセットベクター pTELPuro を以下のようにして作製した。ヒトテロメア配列は、J.J.Harrington ら(Nature Genet., 15, 345-355, 1997)にならって PCR により合成し、プラスミド pBluescript II SK(-)(東洋紡)の EcoRV 部位にクローニングした(pTEL)。次にプラスミド pGKPuro(WHITEHEAD INSTITUTE, Dr. Peter W. Laird から分与)の EcoRI 部位を NotI 部位に変え、制限酵素 NotI(ベーリンガー)で切り出した DNA 断片(ピューロマイシン耐性遺伝子カセット)をプラスミド pTEL の NotI 部位にクローニングした(pTELPuro、図 6 5)。

#### (実施例 9 2) ターゲティングベクター pTELPuroCD8A(F), (R) の作製

ヒト 2 番染色体上の CD8A 遺伝子座(Igκ領域の極テロメア側に位置)にヒトテロメア配列を挿入するためのターゲティングベクター pTELPuroCD8A(F), (R)を以下のようにして作製した。CD8A 遺伝子の転写方向がセントロメア→テロメアか、テロメア→セントロメアかが不明のため、(F), (R)の 2 方向のターゲティングベクターを作製した。まず、ヒト CD8A 遺伝子座のゲノム領域を以下のプライマーを用いて PCR により増幅した。

CD8A-F; 5'-TCGAGGATCCCTTTAGTGAAGGCAAAGGAAGGGACACTC-3' (配列番号 8 3)



CD8A-R: 5'-TCGAGGATCCTGTAAAGGGGTAGCCTGTCCTCTTTCATG-3' (配列番号 84)  
PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq  
ポリメラーゼは LA Taq(宝酒造)を用い、バッファーや dNTP(dATP, dCTP, dGTP,  
dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94℃  
1 分の熱変性後、98℃ 10 秒、65℃ 10 分を 35 サイクル行った。PCR 産物をブ  
ロテネース K (ギブコ) 処理した後、CHROMA SPIN-TE400 (クローンテック)  
でゲル濾過した。その後、制限酵素 BamHI (ベーリンガー) で切断し CHROMA  
SPIN-TE1000 (クローンテック) でゲル濾過した。この PCR 断片をプラスミド  
pTELPuro の BamHI 部位にクローニングした。クローニングされた CD8A ゲノ  
ム断片がヒトテロメア配列と同方向のものを(F)、逆方向のものを(R)とした  
[pTELPuroCD8A(F), (R)、図 66, 67]。

(実施例 93) ニワトリ DT-40 細胞中での loxPHyg カセットのヒト 22 番染色  
体上への部位特異的挿入

LIF 遺伝子座でテロメアトランケーションしたヒト 22 番染色体断片を保  
持するニワトリ DT-40 細胞 (黒岩ら、Nucleic Acid Research, 26:3447-3448,  
1998) に上記 (実施例 88) で作製したターゲティングベクター  
pHCF2loxPHyg(F), (R)をトランスフェクションし、HCF2 遺伝子座に loxPHyg  
カセットを挿入することを試みた。

ニワトリ DT-40 細胞の培養は 10%ウシ胎児血清 (ギブコ、以下 FBS で記す)、  
1%ニワトリ血清 (ギブコ)、 $10^{-4}$ M 2-メルカプトエタノール (シグマ) を添加  
した RPMI1640 培地 (ギブコ) 中で行った。約  $10^7$  個の細胞を無添加 RPMI1640  
培地で一回洗浄し、0.5 ml の無添加 RPMI1640 培地に懸濁し、制限酵素 NotI  
(ベーリンガー) で線状化したターゲティングベクター pHCF2loxPHyg(F),  
(R)を 25-30  $\mu$ g 加え、エレクトロポレーション用のキュベット (バイオラッ  
ド) に移し、室温で 10 分間静置した。キュベットをジーンパルサー (バイオ  
ラッド) にセットし、550 V, 25  $\mu$ F の条件で電圧印加した。室温で 10 分間  
静置後、24 時間培養した。24 時間後、ハイグロマイシン B (1 mg/ml) を含  
む培地に交換し、96 穴培養プレート 5 枚に分注して約 2 週間の選択培養を行

った。ハイグロマイシン B 耐性クローンから Puregene DNA Isolation Kit (Gentra System 社) を用いてゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を制限酵素 HpaI と XhoI (ベーリンガー) で切断し、0.8%アガロースゲル中で電気泳動し、ニトロセルロースフィルター (DuPont 社) へアルカリブロットティングした。このフィルターに対して HCF2 プロブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、相同組換え体の同定を行った。HCF2 プロブの作製は以下のプライマーを用いてヒトゲノムを鋳型として PCR を行い、その PCR 産物を鋳型にしてランダムプライミングによる  $^{32}\text{P}$  標識 DNA プロブを作製した (アマシャム、添付のプロトコールに従った)。

HCF2-F4; 5'-CACATGACAAGAGCTCAGCG-3' (配列番号 8 5)

HCF2-R4; 5'-TCTGACTTCCTCATGAGAGCC-3' (配列番号 8 6)

PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは Ex Taq (宝酒造) を用い、バッファーや dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94°C 1 分の熱変性後、98°C 10 秒、65°C 30 秒、72°C 1 分を 35 サイクル行った。ターゲティングベクター pHCF2loxPHyg(F) の場合、非相同組換え体では >20 kb、相同組換え体では 8.7 kb のバンドが検出される。ターゲティングベクター pHCF2loxPHyg(R) の場合、非相同組換え体では >20 kb、相同組換え体では 9.5 kb のバンドが検出される (図 6 1, 6 2)。サザンハイブリダイゼーションの結果、ターゲティングベクター pHCF2loxPHyg(F) においては 52 クローン中 41 クローン、(R) においては 60 クローン中 28 クローンが目的の相同組換え体であった (それぞれ HF, HR クローンと呼ぶ)。

(実施例 9 4) ニワトリ DT-40 細胞中での loxPbsr カセットのヒト 14 番染色体上への部位特異的挿入

ヒト 14 番染色体断片 SC20 を保持するニワトリ DT-40 細胞 (黒岩ら、Nucleic Acid Research 26:3447, 1998; 京都大学医学部、武田俊一教授より分与) に上記 (実施例 8 9) で作製したターゲティングベクター pRNR2loxPbsr をトランスフェクションし、RNR2 遺伝子座に loxPbsr カセットを挿入するこ

とを試みた。

上記と同様にして、制限酵素 SrfI (東洋紡) で線状化したターゲティングベクター pRNR2loxPbsr をトランスフェクションし、ブラストサイジン S (10 µg/ml) 存在下で約 2 週間選択培養した。耐性クローンからゲノム DNA を抽出して以下のプライマーを用いて PCR により相同組換え体の同定を行った (図 6 3)。

RNR2-1; 5'-TGGATGTATCCTGTCAAGAGACC-3' (配列番号 8 7)

STOP-3; 5'-CAGACACTCTATGCCTGTGTGG-3' (配列番号 8 8)

PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは LA Taq (宝酒造) を用い、バッファーや dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94°C 1 分の熱変性後、98°C 10 秒、65°C 5 分を 35 サイクル行った。この結果、60 クローン中 8 クローンにおいて予想通りの約 2.5 kb の PCR 産物が増幅され、相同組換え体を得られた (R クローンと呼ぶ)。

(実施例 9 5) ニワトリ DT-40 細胞中でのヒト 2 番染色体の部位特異的切断  
ヒト 2 番染色体全長を保持するニワトリ DT-40 細胞 (黒岩ら、Nucleic Acid Research 26:3447, 1998; 京都大学医学部、武田俊一教授より分与) に上記 (実施例 9 2) で作製したターゲティングベクター pTELPuroCD8A(F), (R) をトランスフェクションし、CD8A 遺伝子座にヒトテロメア配列を挿入することによって、その挿入部位で 2 番染色体を切断することを試みた。

上記と同様にして、制限酵素 SrfI (東洋紡) で線状化したターゲティングベクター pTELPuroCD8A(F), (R) をトランスフェクションし、ピューロマイシ (0.3 µg/ml) 存在下で約 2 週間選択培養した。耐性クローンからゲノム DNA を抽出して以下のプライマーを用いて PCR により相同組換え体の同定を行った (図 6 6、6 7)。

ターゲティングベクター pTELPuroCD8A(F) 用

CD8A-3; 5'-GCCCTCATGGAAATCTCCTGGG-3' (配列番号 8 9)

CDPuro-1; 5'-GCAGCAACAGATGGAAGGCCTC-3' (配列番号 9 0)

ターゲティングベクター pTELPuroCD8A (R)用

CD8A-2; 5'-GAACAGAAAGCCACTCTTGCTTTCCAT-3' (配列番号 9 1)

CDPuro-2; 5'-ACCGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCAC-3' (配列番号 9 2)

PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは LA Taq(宝酒造)を用い、バッファーや dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94℃ 1 分の熱変性後、98℃ 10 秒、68℃ 10 分を 35 サイクル行った。この結果、(F) においては 95 クローン中 2 クローン、(R)においては 160 クローン中 2 クローンで予想通りの PCR 産物が増幅され、相同組換え体を得られた(それぞれ CD, CR クローンと呼ぶ)。

次に、相同組換え体 CD, CR クローンにおいて、CD8A 遺伝子座で 2 番染色体の切断が起こっているか否かを PCR 及び FISH 解析によって調べた。

#### (1) PCR 解析

2 番染色体上の遺伝子及び多型マーカの存在(図 6 8)を以下のプライマーを用いて PCR により検出した。D2S373, D2S113, D2S388, D2S1331, D2S134, D2S171, TP0 検出用のプライマーは BIOS 社のものを用いた。

#### Vκ3 検出用プライマー

Vκ3-F; 5'-CTCTCCTGCAGGGCCAGTCA-3' (配列番号 9 3)

Vκ3-R; 5'-TGCTGATGGTGAGAGTGAAGTC-3' (配列番号 9 4)

#### Cκ検出用プライマー

Cκ-F; 5'-TGGAAGGTGGATAACGCCCT-3' (配列番号 9 5)

Cκ-R; 5'-TCATTCTCCTCCAACATTAGCA-3' (配列番号 9 6)

PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは Ex Taq(宝酒造)を用い、バッファーや dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94℃ 1 分の熱変性後、98℃ 10 秒、56-60℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 35 サイクル行った。結果を図 6 8 に示した。ヒト 2 番染色体全長を保持するニワトリ DT-40 細胞クローン 521D4 においては、全てのマーカが検出されているのに対して、相同組換え体 CD クローン (CD10) においては、CD8A よりもテロメア側に位置

するマーカは全て消失していた。一方、相同組換え体 CR クローンにおいては、全てのマーカが検出された。

## (2) FISH 解析

ヒト 2 番染色体が CD8A 遺伝子座で切断されていることを視覚的に判断するためにターゲティングベクター中のピューロマイシン耐性遺伝子を検出できる pGKPuro プローブを用いた FISH を行った(図 6 9)。方法は黒岩ら (Nucleic Acid Research, 26:3447-3448, 1998) に従った。COT1 染色 (ローダミン標識、赤色) により、521D4 と比較して CD クローン (CD10) では、2 番染色体が断片化していることが分かる。さらに、pGKPuro プローブ由来のシグナル (FITC 標識、黄色) がテロメア一端に検出された。このことはターゲティングベクターが挿入された CD8A 遺伝子座が 2 番染色体断片のテロメア一端になっていることを示している。また、CR クローンにおいては、pGKPuro プローブ由来のシグナルが 2p12 に認められ、全く断片化が起こっていないことが判明した。

以上の結果から、相同組換え体 CD クローンにおいて、ヒト 2 番染色体が CD8A 遺伝子座で切断されていると結論できた。また、CR クローンでは切断化が起こらなかったことから CD8A 遺伝子の転写方向はセントロメア→テロメアであると考えられる。このように、転写方向の不明な遺伝子座において、今回のように両方向でテロメアトランケーションをすることで転写方向を決定することにも応用できる。

(実施例 9 6) ニワトリ DT-40 細胞中での loxPHyg カセットのヒト 2 番染色体上への部位特異的挿入

上記 (実施例 95) で得られた CD8A 遺伝子座でテロメアトランケーションしたヒト 2 番染色体断片を保持するニワトリ DT-40 細胞 CD クローンに上記 (実施例 90) で作製したターゲティングベクター pYHZloxPHyg をトランスフェクションし、cosYHZ304 ゲノム領域に loxPHyg カセットを挿入することを試みた。

上記と同様にして、制限酵素 SrfI (東洋紡) で線状化したターゲティング

ベクター pYHZloxPHyg をトランスフェクションし、ハイグロマイシン B (1 mg/ml) 存在下で約 2 週間選択培養した。耐性クローンからゲノム DNA を抽出して以下のプライマーを用いて PCR により相同組換え体の同定を行う (図 6 4)。

YHZ-2; 5'-TCCTCTTTTTCCTTCCTTTGCCTC-3' (配列番号 9 7)

Yhyg-2; 5'-ATTATTTTGGGCGTTGCGTGG-3' (配列番号 9 8)

PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは LA Taq(宝酒造)を用い、バッファーや dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94℃ 1 分の熱変性後、98℃ 10 秒、65℃ 5 分を 35 サイクル行う。この解析により相同組換え体の同定ができる (Y クローンと呼ぶ)。

(実施例 9 7) ヒト抗体重鎖遺伝子クラスターとλ軽鎖遺伝子クラスターの両方を有するヒト人工染色体 λ-HAC の構築

一般記載で記したように、マウス中でより安定にかつ効率良く完全なヒト抗体を発現させるために、HCF2-Igλ-LIF から成るヒト 2 2 番染色体断片をヒト IgH を含む 1 4 番染色体断片 SC20 上の RNR2 遺伝子座に転座させることによって、ヒト抗体重鎖遺伝子クラスターとλ軽鎖遺伝子クラスターの両方を有するヒト人工染色体 λ-HAC を構築することを試みた。

まず、最初に上記 (実施例 9 3, 9 4) で得られた相同組換え体 HF, HR クローンを相同組換え体 R クローンと細胞融合することによって、ヒト 2 2 番染色体断片と 1 4 番染色体断片 SC20 断片の両者を保持する DT40 ハイブリッドを作製した。

(1) ヒト 2 2 番染色体断片と 1 4 番染色体断片 SC20 断片の両者を保持する DT40 ハイブリッドの作製

R クローンはブラストサイジン S (10 µg/ml) 含有 RPMI1640 培地で、HF クローンはハイグロマイシン B (1 mg/ml) 含有 RPMI1640 培地で培養した。1-2 x 10<sup>7</sup> 個の両クローンを混合し遠心後、無血清 RPMI1640 培地で 2 回洗浄した。残量培地を完全に取り除いた後に、予め 37℃ で保温しておいた 50% PEG 1500

(ペーリンガー) 0.5 ml を静かに加え、約 2 分間ピペットで激しく混合した。その後、無血清 RPMI1640 培地 1 ml を 1 分間かけてゆっくり加え、続いて無血清 RPMI1640 培地 9 ml を約 3 分間かけて加え、37℃で 10 分間静置した。その後、1,200 rpm で 5 分間遠心し、血清を含む RPMI1640 培地で 24-48 時間培養した。その後、ブラストサイジン S (10 µg/ml)・ハイグロマイシン B (1 mg/ml) 含有 RPMI1640 培地に交換し、24 穴培養プレート 5 枚に分注し、3-4 週間培養した。同様にして、HR クローンと R クローンも細胞融合した。HF クローンと R クローンとの細胞融合から得られたハイブリッド (RHF クローンと呼ぶ)、HR クローンと R クローンとの細胞融合から得られたハイブリッド (RHR クローンと呼ぶ) からゲノム DNA を抽出して、以下のプライマーを用いて PCR を行い、ヒト 14 番、22 番染色体の 2 本が保持されていることを確認した。

#### ヒト 14 番染色体検出用プライマー

VH3-F; 5'-AGTGAGATAAGCAGTGGATG-3' (配列番号 99)

VH3-R; 5'-GTTGTGCTACTCCCATCACT-3' (配列番号 100)

#### ヒト 22 番染色体検出用プライマー

Igλ -F; 5'-GAGAGTTGCAGAAGGGGTGACT-3' (配列番号 101)

Igλ -R; 5'-GGAGACCACCAAACCTCCAAA-3' (配列番号 102)

PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは Ex Taq(宝酒造)を用い、バッファーや dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94℃ 1 分の熱変性後、98℃ 10 秒、56℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 35 サイクル行った。PCR の結果、RHF クローンは 6 クローン、RHR クローンは 2 クローンが VH3 と Igλ の両方に陽性であった。さらに、ヒト COT1 DNA をプローブに用いて FISH を行った結果、これらのクローンは全て 2 本のヒト染色体を独立した状態で保持していることが明らかとなった。以上の結果から、RHF, RHR ハイブリッドクローンはヒト 14 番、22 番染色体の 2 本を保持していると判断できた。

(2) RHF, RHR ハイブリッドクローンにおけるヒト 22 番染色体断片の 14 番染色体断片 SC20 への部位特異的転座

## (2)-1 Cre 組換え酵素安定発現ベクター pBS185hisD の構築

一般記載で記したように、ヒト染色体の部位特異的転座は Cre-loxP システムを用いることによって行う。このシステムにおいても、今回のように非相同染色体間での組換え効率は非常に低いことが予想されるため、Cre 酵素を一過性ではなく安定発現させることを考え、以下のような発現ベクターを構築した。

Cre 組換え酵素発現ベクター pBS185 (ギブコ) を制限酵素 EcoRI (ベーリンガー) で切断し、BglII リンカーを挿入した (pBS185Bg)。一方、ヒスチデノール耐性遺伝子カセットを含むプラスミド #1-132 (京都大学医学部 武田俊一教授より分与) から制限酵素 BamHI (ベーリンガー) でヒスチデノール耐性遺伝子カセットを切り出し、pBS185Bg の BglII 部位にクローニングした (pBS185hisD, 図 70)。

## (2)-2 Cre-loxP システムを用いた RHF, RHR ハイブリッドクローンにおけるヒト 22 番染色体断片の 14 番染色体断片 SC20 への部位特異的転座

上記と同様に、制限酵素 KpnI (ベーリンガー) で線状化した Cre 組換え酵素安定発現ベクター pBS185hisD を RHF, RHR ハイブリッドクローンにそれぞれトランスフェクションし、ヒスチデノール (0.5 mg/ml) 存在下で約 2 週間選択培養した。その後、6 穴培養プレート 4 枚に耐性細胞集団を分注し (24 プール)、任意に 2 プールを選んで約  $10^7$  個になるまで培養した。

細胞プールを 5% FBS と 1  $\mu$ g/ml のプロピディウムアイオダイド (PI) を添加した PBS (リン酸緩衝溶液) 4ml に懸濁し、FACSVantage (ベクトン・ディッキンソン) により解析した。前述したように、loxP 間での組換え転座が起こると GFP 遺伝子が再構築され発現するので転座を起こした細胞を FACS で検出できる。GFP 陽性と思われる細胞画分のソーティングを 4 回繰り返した。毎回のソーティング後の培養はハイグロマイシン B (1 mg/ml) 含有 RPMI1640 培地で行った (後述するように、アセントリック染色体を保持する細胞を除くため)。その結果、RHF クローンからは GFP 陽性細胞を 98-99% の純度で濃縮することができたが、RHR クローンからは全く濃縮できなかった。このことは、図 71 に示したように RHF クローンにおいては 2 つの loxP の方向がセン



トロメア→テロメアという方向で一致しており、転座後も正常な染色体構造になるのに対して、RHRでは2つの loxP の方向が一致していないために転座後の染色体がセントロメアを2つ持つ染色体 (dicentric chromosome) とセントロメアを持たない染色体 (acentric chromosome) になるため、例えば、ハイグロマイシン B 存在下では増殖できず、濃縮されないと考えられる。このことから、本システムにおける転座実験の特異性を示すことができる。因みに、このことから HCF2 遺伝子はセントロメア→テロメアの方に転写されると推察できる。

次に、FACS でクローニングされた RHF 由来の2クローン (SF2-21 と SF2-23 と呼ぶ) において、期待通り loxP 間で組換えが起こっていることを PCR によって確認した。SF2-21 と SF2-23 からゲノム DNA を抽出して以下のプライマーを用いて PCR を行った。

PGK-1; 5'-ATAGCAGCTTTGCTCCTTCG-3' (配列番号 103)

GFP-1; 5'-TTCTCTCCTGCACATAGCCC-3' (配列番号 104)

PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは Ex Taq(宝酒造)を用い、バッファーや dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は 94℃ 1 分の熱変性後、98℃ 10 秒、61℃ 30 秒、72℃ 1 分を 35 サイクル行った。図 7 2 に示すように、このプライマーで約 600 bp の PCR 産物が得られれば、loxP 間で組換えが起こっていることが示唆される。結果を図 7 3 に示した。Cre 組換え酵素安定発現ベクターをトランスフェクションしていない RHF クローンでは PCR 産物が得られなかったのに対して、SF2-21 と SF2-23 においては、約 600 bp の PCR 産物が得られた。

さらに、SF2-21 と SF2-23 に対して、ヒト 14q ter 特異的プローブ (ヒト 14 番染色体長腕テロメア領域を検出、FITC 標識) と pGKPuro プローブ (ヒト 22 番染色体断片の長腕テロメア領域を検出、ローダミン標識) を用いた FISH を行った結果、同一染色体上の両末端テロメア領域に FITC シグナルとローダミンシグナルが検出された (図 7 4)。また、ヒト 14 番染色体特異的プローブ (ローダミンラベル) とヒト 22 番染色体特異的プローブ (FITC ラ

ベル)で FISH を行った際にも同一染色体上に両方のプローブ由来のシグナルが観察された (図 7 4)。

以上の結果から, SF2-21 と SF2-23 において期待通りの転座が起こり, 同一染色体上にヒト重鎖遺伝子クラスターと  $\lambda$  軽鎖遺伝子クラスターの両方が含まれるヒト人工染色体  $\lambda$ -HAC が構築されたと結論できた。

(実施例 9 8) ヒト抗体重鎖遺伝子クラスターと  $\kappa$  軽鎖遺伝子クラスターの両方を有するヒト人工染色体  $\kappa$ -HAC の構築

$\lambda$ -HAC 構築の実施例と全く同様にして、cosYHZ304-Ig $\kappa$ -CD8A から成るヒト 2 番染色体断片をヒト IgH を含む 1 4 番染色体断片 SC20 上の RNR2 遺伝子座に転座させることによって、ヒト抗体重鎖遺伝子クラスターと  $\kappa$  軽鎖遺伝子クラスターの両方を有するヒト人工染色体  $\kappa$ -HAC を構築することができる。

まず、最初に上記 (実施例 9 6) で得られた相同組換え Y クローンを相同組換え体 R クローンと細胞融合することによって、ヒト 2 番染色体断片と 1 4 番染色体断片 SC20 断片の両者を保持する DT40 ハイブリッドを作製する。

(1) ヒト 2 番染色体断片と 1 4 番染色体断片 SC20 断片の両者を保持する DT40 ハイブリッドの作製

R クローンはブラストサイジン S (10  $\mu$ g/ml) 含有 RPMI1640 培地で、Y クローンはハイグロマイシン B (1 mg/ml) 含有 RPMI1640 培地で培養する。1-2  $\times 10^7$  個の両クローンを混合し遠心後、無血清 RPMI1640 培地で 2 回洗浄する。残量培地を完全に取り除いた後に、予め 37°C で保温しておいた 50% PEG 1500 (ベーリンガー) 0.5 ml を静かに加え、約 2 分間ピペットで激しく混合する。その後、無血清 RPMI1640 培地 1 ml を 1 分間かけてゆっくり加え、続いて無血清 RPMI1640 培地 9 ml を約 3 分間かけて加え、37°C で 1 0 分間静置する。その後、1,200 rpm で 5 分間遠心し、血清を含む RPMI1640 培地で 24-48 時間培養する。その後、ブラストサイジン S (10  $\mu$ g/ml)・ハイグロマイシン B (1 mg/ml) 含有 RPMI1640 培地に交換し、24 穴培養プレート 5 枚に分注し、3-4 週間培養する。得られたハイブリッド (RY クローンと呼ぶ) からゲノム DNA

を抽出して、以下のプライマーを用いて PCR を行い、ヒト 14 番、2 番染色体の 2 本が保持されていることを確認する。

ヒト 14 番染色体検出用プライマー

VH3-F: 5'-AGTGAGATAAGCAGTGGATG-3' (配列番号 105)

VH3-R: 5'-GTTGTGCTACTCCCATCACT-3' (配列番号 106)

ヒト 2 番染色体検出用プライマー

CK-F: 5'-TGGAAGGTGGATAACGCCCT-3' (配列番号 107)

CK-R: 5'-TCATTCTCCTCCAACATTAGCA-3' (配列番号 108)

PCR は、サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の GeneAmp9600 を、Taq ポリメラーゼは Ex Taq(宝酒造)を用い、バッファーや dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は 94℃ 1 分の熱変性後、98℃ 10 秒、56-60℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 35 サイクル行う。さらに、ヒト COT1 DNA をプローブに用いて FISH を行い、2 本のヒト染色体を独立した状態で存在していることを確認する。以上の実験から、RY ハイブリッドクローンがヒト 14 番、2 番染色体の 2 本を保持していることを確認できる。

## (2) RY ハイブリッドクローンにおけるヒト 2 番染色体断片の 14 番染色体断片 SC20 への部位特異的転座

上記と同様にして、制限酵素 KpnI (ベーリンガー) で線状化した Cre 組換え酵素安定発現ベクター pBS185hisD を RY ハイブリッドクローンにトランスフェクションし、ヒスチデノール (0.5 mg/ml) 存在下で約 2 週間選択培養する。その後、6 穴培養プレート 4 枚に耐性細胞集団を分注し (24 プール)、任意にプールを選んで約  $10^7$  個になるまで培養する。

細胞プールを 5% FBS と 1  $\mu$ g/ml のプロピディウムアイオダイド (PI) を添加した PBS (リン酸緩衝溶液) 4ml に懸濁し、FACSVantage (ベクトン・ディッキンソン) により解析し、GFP 陽性と思われる細胞画分のソーティングを数回繰り返す。次に、FACS でクローニングされる RY 由来クローンにおいて、期待通り loxP 間で組換えが起こっていることを同様に PGK-1 プライマーと GFP-1 プライマーとを用いた PCR によって確認できる。さらに、ヒト 14q ter

特異的プローブ（ヒト 1 4 番染色体長腕テロメア領域を検出、FITC 標識）と pGKPuro プローブ（ヒト 2 番染色体断片の短腕テロメア領域を検出、ローダミン標識）を用いる FISH、あるいは、ヒト 1 4 番染色体特異的プローブとヒト 2 番染色体特異的プローブを用いる FISH を行うことにより、同一染色体上にヒト重鎖遺伝子クラスターと  $\kappa$  軽鎖遺伝子クラスターの両方が含まれる人工染色体  $\kappa$ -HAC が構築されたことが結論できる。

（実施例 9 9）DT40 ハイブリッド細胞からのヒト人工染色体  $\lambda$ ,  $\kappa$ -HAC のチャイニーズハムスター CHO 細胞への移入

マウス ES 細胞へ  $\lambda$ ,  $\kappa$ -HAC を導入するために、前述したようにまず、CHO 細胞へ MMCT により導入した。

SF2-21 と SF2-23 DT40 ハイブリッドをそれぞれ直径 150 mm シャーレ 8 枚で培養し、コンフルエントになった時点で 20% FBS, 1% ニワトリ血清、 $10^{-4}$ M 2-メルカプトエタノール、0.05  $\mu$ g/ml コルセミドを添加した RPMI1640 培地に交換し、さらに 3 6 時間培養してマイクロセルを形成させた。細胞を 24 ml の血清 RPMI1640 培地に懸濁し、予め 100  $\mu$ g/ml のポリ L-リジンでコートした遠心用 25  $\text{cm}^2$  フラスコ 1 2 本（コーニング）に 2 ml ずつ分注し、37°C で 1 時間培養し、細胞をフラスコの底に付着させた。培養液を除去し、予め 37°C で保温したサイトカラシン B (10  $\mu$ g/ml, シグマ) 溶液を遠心用フラスコに満たし、34°C, 8000 rpm, 1 時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清 DMEM 培地に懸濁し、8  $\mu$ m, 5 $\mu$ m フィルターにて精製した。精製後、1700 rpm, 10 分間遠心し、無血清 DMEM 培地 5 ml に懸濁した。一方、約  $10^7$  個の CHO 細胞をトリプシン処理によりはがし、無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄し、無血清 DMEM 培地 5 ml に懸濁した。再度、マイクロセルを 1700 rpm, 10 分間遠心し、上清を除かずに先の CHO 懸濁液 5 ml を静かに重層した。遠心後、培養液を除去し、1:1.4 PEG 溶液 [5 g PEG1000 (和光純薬)、DMSO (シグマ) 1 ml を DMEM 6ml に溶解] 0.5 ml を加え、約 2 分間ピペットで激しく攪拌した。その後、無血清 DMEM 培地 10 ml を約 3 分間かけてゆっくり加え、37 度で 10 分間静置した。遠心後、10% FBS 添加 F12 培地 (ギブコ) に細胞を懸濁し、24 穴培養プレー

ト 10 枚に分注し、37℃で 24 時間培養した。その後、G418 800 µg/ml 含有 F12 培地に交換し、3-4 週間選択培養した。

G418 耐性クローンからゲノム DNA を抽出して Igλ と VH3 検出用プライマー及び PGK-1, GFP-1 プライマーを用いて、前述と同様の条件で PCR を行い、λ-HAC を保持する CHO クローンを同定した（データは示さない）。さらに、上記 PCR で陽性だったクローンに対して、ヒト 14 番染色体、22 番染色体特異的プローブを用いて FISH を行い、視覚的に λ-HAC の存在を確認した。これらの結果から、λ-HAC を保持する CHO 細胞クローンが得られたと結論できた。

全く同様にして κ-HAC を保持する CHO 細胞をクローニングできる。

（実施例 100）CHO 細胞からの λ, κ-HAC のマウス ES 細胞への移入

λ, κ-HAC を保持するキメラマウスを作製するために、上記（実施例 99）で得られた λ, κ-HAC を保持する CHO 細胞からマウス ES 細胞へ MMCT により導入する。

富塚ら（Nature Genet. 16:133, 1997）の方法に従い、約  $10^8$  個の λ, κ-HAC を保持する CHO 細胞からマイクロセルを精製し、DMEM 5 ml に懸濁する。約  $10^7$  個のマウス ES 細胞 TT2F をトリプシン処理により剥がし、DMEM で 3 回洗浄後 DMEM 5 ml に懸濁し、遠心したマイクロセルに加え、1250 rpm で 10 分間遠心し、上清を完全に取り除く。沈殿をタッピングにより十分ほぐし、1:1.4 PEG 溶液 [5g PEG 1000(和光純薬)、1 ml DMSO (シグマ)] を DMEM 6 ml に溶解] 0.5 ml を加え、約 1 分 30 秒間、十分攪拌する。その後、DMEM 10ml をゆっくり加え、1250 rpm で 10 分間遠心し、30 ml の ES 培地に懸濁し、予めフィーダー細胞をまいた直径 100 mm シャーレ（コーニング）3 枚に分注し、培養する。24 時間後、300 µg/ml の G418 を含む培地に交換し、約 1 週間選択培養する。薬剤耐性コロニーからゲノム DNA を抽出して Igλ または Cκ と VH3 検出用プライマーを用いて、前述と同様の条件で PCR を行う。さらに、~~ヒト 14 番染色体と 22 番、または 2 番染色体特異的プローブを用いて FISH~~を行う。これらの結果から、目的のヒト人工染色体 λ, κ-HAC を保持する ES

細胞クローンが得られたと結論できる。

(実施例 101) ヒト人工染色体  $\lambda$ ,  $\kappa$ -HAC を保持するキメラマウスの作製

上記(実施例 100)で得られる ES 細胞クローンを用いて(実施例 10)等で示した方法でキメラマウス作製する。宿主としては ICR、MCH(日本クレア)、あるいは(実施例 67-(1))で確立された抗体重鎖ノックアウトマウスの雌雄交配により得られる 8 細胞期胚を用いることができる。注入胚を仮親に移植した結果生まれる子マウスは毛色によりキメラであるかどうかを判定できる(実施例 68-(3))。ヒト人工染色体  $\lambda$ -HAC あるいは  $\kappa$ -HAC をそれぞれ保持する ES 細胞株からキメラマウスが得られる。すなわち、ヒト人工染色体  $\lambda$ -HAC あるいは  $\kappa$ -HAC をそれぞれ保持する ES 細胞株はキメラ形勢能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示される。

(実施例 102) ヒト人工染色体  $\lambda$ -HAC、 $\kappa$ -HAC を保持するキメラマウスにおける完全ヒト抗体の発現

キメラマウスにおける HAC の保持は PCR 解析、FISH 解析(実施例 97)、(実施例 98)、(Tomizuka ら, Nature Genetics, 16, 133-143)に記載された方法等により示される。また、 $\lambda$ -HAC を保持するキメラマウスにおけるヒト Ig  $\lambda$  鎖、ヒト Ig 重鎖及びヒト Ig  $\lambda$  鎖/重鎖からなる完全なヒト抗体分子の発現は(実施例 65)に記載された方法で確認される。 $\kappa$ -HAC を保持するキメラマウスにおけるヒト Ig  $\kappa$  鎖、ヒト Ig 重鎖及びヒト Ig  $\kappa$  鎖/重鎖からなる完全なヒト抗体分子の発現は(実施例 65)に記載された方法で確認される。

(実施例 103) ヒト人工染色体  $\lambda$ -HAC、 $\kappa$ -HAC を保持するキメラマウスからの  $\lambda$ -HAC、 $\kappa$ -HAC の子孫伝達

キメラマウスからの  $\lambda$ -HAC 及び  $\kappa$ -HAC の子孫伝達を(実施例 68-(4))に記載された方法で検討する。その結果、 $\lambda$ -HAC あるいは  $\kappa$ -HAC をそれぞれ保持し、子孫伝達するマウス系統が確立される。当該マウス系統における HAC

の保持は PCR 解析、FISH 解析(実施例 97)、(実施例 98)、(Tomizuka ら、Nature Genetics, 16, 133-143)に記載された方法等により示される。また、 $\lambda$ -HAC を保持し、子孫伝達するマウス系統におけるヒト Ig $\lambda$ 鎖、ヒト Ig 重鎖及びヒト Ig $\lambda$ 鎖/重鎖からなる完全なヒト抗体分子の発現は(実施例 65)に記載された方法で確認される。 $\kappa$ -HAC を保持し、子孫伝達するマウス系統におけるヒト Ig $\kappa$ 鎖、ヒト Ig 重鎖及びヒト Ig $\kappa$ 鎖/重鎖からなる完全なヒト抗体分子の発現は(実施例 65)に記載された方法で確認される。さらに(実施例 73)等により示される通り、 $\lambda$ -HAC あるいは  $\kappa$ -HAC を保持し子孫伝達するマウス系統を内在性抗体重鎖、軽鎖  $\kappa$  遺伝子を欠損しているマウス系統と繰り返し交配し、各 HAC を保持しかつ内在性抗体重鎖及び  $\kappa$  鎖遺伝子欠損についてホモであるマウス系統を得ることができる。これらの系統においては主として完全なヒト抗体が産生される。

$\lambda$ -HAC あるいは  $\kappa$ -HAC をそれぞれ保持し、子孫伝達するマウス系統における各 HAC の安定保持を(実施例 68-(5))に記載された方法で検討する。その結果、当該マウス系統体細胞における各 HAC の安定保持が示される。

(実施例 104) LIF 遺伝子座でテロメアトランケーションされたヒト 22 番染色体断片のチャイニーズハムスター CHO 細胞への移入

マウス ES 細胞へ LIF 遺伝子座でテロメアトランケーションされたヒト 22 番染色体断片を導入するために、CHO 細胞へ MMCT により導入した。LIF 遺伝子座でテロメアトランケーションされたヒト 22 番染色体断片を保持するニワトリ DT-40 細胞クローンを直径 150 mm シャーレ 8 枚で培養し、コンフルエントになった時点で 20% FBS, 1% ニワトリ血清、 $10^{-4}$ M 2-メルカプトエタノール、0.05  $\mu$ g/ml コルセミドを添加した RPMI1640 培地に交換し、さらに 36 時間培養してマイクロセルを形成させた。細胞を 24 ml の血清 RPMI1640 培地に懸濁し、予め 100  $\mu$ g/ml のポリ L-リジンでコートした遠心用 25 cm<sup>2</sup> フラスコ 12 本(コーニング)に 2 ml ずつ分注し、37°C で 1 時間培養し、細胞をフラスコの底に付着させた。培養液を除去し、予め 37°C で保温したサイトカラシン B(10  $\mu$ g/ml, シグマ)溶液を遠心用フラスコに満たし、34°C, 8000

rpm, 1 時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清 DMEM 培地に懸濁し、8  $\mu$ m, 5  $\mu$ m フィルターにて精製した。精製後, 1700 rpm, 10 分間遠心し、無血清 DMEM 培地 5 ml に懸濁した。一方, 約  $10^7$  個の CHO 細胞をトリプシン処理によりはがし、無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄し、無血清 DMEM 培地 5 ml に懸濁した。再度, マイクロセルを 1700 rpm, 10 分間遠心し、上清を除かずに先の CHO 懸濁液 5 ml を静かに重層した。遠心後, 培養液を除去し, 1:1.4 PEG 溶液 [5 g PEG1000 (和光純薬)、DMSO (シグマ) 1 ml を DMEM 6ml に溶解] 0.5 ml を加え, 約 2 分間ピペットで激しく攪拌した。その後, 無血清 DMEM 培地 10 ml を約 3 分間かけてゆっくり加え, 37 度で 10 分間静置した。遠心後, 10% FBS 添加 F12 培地 (ギブコ) に細胞を懸濁し、24 穴培養プレート 10 枚に分注し、37°C で 24 時間培養した。その後, G418 800  $\mu$ g/ml 含有 F12 培地に交換し, 3-4 週間選択培養した。

G418 耐性クローンからゲノム DNA を抽出して Ig $\lambda$ , D22S315, D22S272, D22S278 検出用プライマーと Puro-1, LIF-1 プライマーを用いて PCR を行った (黒岩ら、Nucleic Acid Research, 26:3447-3448, 1998)。その結果, 予想通り D22S272, D22S278 の 2 つのマーカは検出されなかったが、他のマーカは全て検出された。さらに、ヒト COT1 DNA プローブと pGKPuro プローブを用いて FISH を行ったところ、ヒト 22 番染色体断片 2 本が保持されており、そのテロメア一端に pGKPuro プローブ由来のシグナルが観察された。これらの結果から、LIF 遺伝子座でテロメアトランケーションされたヒト 22 番染色体断片を 2 本保持する CHO 細胞クローンが得られたと結論できた。

(実施例 105) ヒト 14 番染色体断片 (SC20) を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$  鎖欠損マウス ES 細胞へのヒト 22 番染色体断片 (C68) の導入

実施例 61-(1) に記載された方法で取得された内在性抗体重鎖及び  $\kappa$  鎖欠損かつヒト 14 番染色体断片 (SC20) を保持するマウス ES 細胞株 HKD2-1 に (実施例 83) で取得されたヒト 22 番染色体断片 (C68) をマイクロセル法により導入した。染色体供与細胞として (実施例 104) で取得されたヒト 22 番染色体断片を 2 本保持する CHO 細胞クローン C68-6 を用いた点を除いて (実施例 35) に記載された方



法を用いた。その結果得られたピューロマイシン、G418、2重耐性株、NLH(CH01)についてPCR解析を行ない、導入染色体断片の保持を確認した。使用したプライマーは14番染色体断片についてはD14S543(実施例68)、22番染色体断片についてはIg $\lambda$ 及びD22S315の2種(実施例2)の計3種である。その結果、NLH(CH01)株において3種全てのマーカーの存在が確認された。さらにヒト染色体特異的プローブを用いたFISH解析も行なった(実施例68)。50個の核板を検鏡した結果、45個(90%)の核板においてプローブにハイブリダイズする独立した2本の染色体断片が観察された。2本の染色体断片はそれぞれヒト14番染色体断片(SC20)、ヒト22番染色体断片(C68)と考えられる。すなわち、NLH(CH01)株は14番染色体断片(SC20)及び22番染色体断片(C68)を同時に保持することが示された。

(実施例106)ヒト14番染色体断片(SC20)及びヒト22番染色体断片(C68)を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に注入して作製されたキメラマウス血清におけるヒト抗体の検出、定量

(実施例105)で取得されたマウスES細胞株NLH(CH01)からのキメラマウス作製は(実施例10)等で示した方法により行なった。宿主胚としては(実施例67-(1))で確立された抗体重鎖ノックアウトマウスの雌雄交配により得られた8細胞期胚を用いた。計307個の注入胚を移植した結果、32匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は毛色において宿主胚(ICR)由来の白色の中にTT2細胞由来の野性色(濃茶)が認められるかどうかにより判定される。誕生した32匹のうち毛色に明らかに野性色のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は14匹であった。この結果より、ヒト14番染色体断片(SC20)及びヒト22番染色体断片(C68)を同時に保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞株NLH(CH01)はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが確認された。

生後6～10週令のNLH(CH01)由来キメラマウスより採血し、血清中の各種ヒト免疫グロブリン濃度及びマウス免疫グロブリン $\lambda$ 鎖濃度を(実施例14)、(実施例32)、(実施例85)に従いELISA法で定量した。結果を表29に示す。高濃度のヒト $\mu$ 鎖、 $\gamma$ 鎖及び $\lambda$ 鎖がキメラマウス血清中において検出された。遺伝子破

壊されていないマウス $\lambda$ 鎖も検出されたが、その濃度はヒト $\lambda$ 鎖より低かった。

これらの結果は、当該キメラマウスにおいてヒト重鎖とヒト $\lambda$ 鎖より構成される完全ヒト抗体分子が、ヒト重鎖とマウス $\lambda$ 鎖より構成されるハイブリッド抗体分子と比較して優位に発現していることを示している。すなわち、ニワトリDT-40細胞を経由したヒト染色体がマウス個体において機能し、そのヒト染色体上のヒト遺伝子にコードされるタンパク質が発現することが確認された。

キメラマウスからのC68断片のの子孫伝達を（実施例68-(4)）に記載された方法で検討する。その結果、C68断片を保持し、子孫伝達するマウス系統が確立される。当該マウス系統におけるC68断片の保持はPCR解析、FISH解析（実施例105）等により示される。さらに、当該マウス系統を14番染色体断片(SC20)を保持し子孫伝達するマウス系統と交配することにより、C68断片、SC20断片を同時に保持するマウス系統(C68+SC20)を得ることができる。マウス系統(C68+SC20)におけるヒトIg $\lambda$ 鎖、ヒトIg重鎖及びヒトIg $\lambda$ 鎖/重鎖からなる完全なヒト抗体分子の発現は（実施例65）に記載された方法で確認される。

表29

個体名	ヒト $\mu$ 鎖	ヒト $\gamma$ 鎖	ヒト $\lambda$ 鎖	マウス $\lambda$ 鎖	(mg/l)
C-1	840	90	1300	150	
C-3	560	170	470	170	
C-12	980	650	1700	440	

（実施例107）ヒト14番染色体断片(SC20)及びヒト22番染色体断片(C68)を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に注入して作製されたキメラマウスからのHSA特異的ヒト抗体産生ハイブリドーマ取得

（実施例106）で作製されたキメラマウスC-10(NLH(CH01)由来、キメラ率30%)に対してHSAによる免疫を行った。PBSに溶解したヒト血清アルブミン(HSA、

シグマ、A3782)とアジュバント(TiterMaxGold, Cytrx)とを混合して0.25mg/mlのHSA溶液を調製し、その0.15mlを皮下の計3箇所各0.05mlずつ2回免疫した。生後7週齢に初回免疫しその21日後に2回目の免疫を行った。(実施例61)あるいは(実施例66)に従い、100倍に希釈した血清中の抗HSA抗体濃度を測定した。結果を図75に示す。抗HSAヒト抗体濃度の上昇が確認されたため、さらに30日目にPBSに溶解したHSAを最終免疫した。(実施例66)に従いハイブリドーマ作製しクローニングを行った結果、1個のHSA特異的ヒト $\mu$ 鎖かつヒト $\lambda$ 鎖を産生するクローンを得た。

これらの結果より、ニワトリDT-40細胞を経由したヒト染色体より発現するヒトIg $\lambda$ 鎖はHSAと特異的に結合する、すなわち機能的であることが示された。

(実施例108) ヒト14番染色体断片及びヒト22番染色体断片を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に注入して作製されたキメラマウス体細胞における導入ヒト染色体断片保持

(実施例106)で作製されたキメラマウスC-12(NLH(CH01)由来、キメラ率99%)の尻尾より(Tomizukaら, Nature Genetics, 16, 133-143)に記載された方法で尻尾由来繊維芽細胞を培養した。繊維芽細胞からの染色体サンプル調製及びFISH解析は(Tomizukaら, 前記)に従って行った。50個の核板を検鏡した結果、ヒトCOT-1プローブとハイブリダイズする2本の独立した染色体を含む核板は21個(42%)であった。この2本の染色体断片はそれぞれ14番染色体断片(SC20)、22番染色体断片(C68)と考えられる。すなわち、当該キメラマウス体細胞において2種の染色体断片が保持されることが示された。

(実施例109) ヒト14番染色体部分断片及びヒト22番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、軽鎖欠損マウスES細胞を免疫不全マウス宿主胚に移入して作製したキメラマウスからの糖鎖抗原(GM2)に対する得完全ヒト抗体産生ハイブリドーマの取得

(実施例84-(3))で得たハイブリドーマを96wellプレートを用いてG418

存在下で選択培養し、その培養液中の抗体を（実施例 84-（3））に従い ELISA にてスクリーニングした。限界希釈法にてクローニングし、抗体生産ハイブリドーマを 11 クローン得た。培養上清中の抗体を ELISA により解析し、得られたモノクローナル抗体が GM2 に結合することを確認した。

以上の結果より本キメラマウスにおいて糖鎖抗原のガングリオシド GM2 に対する完全ヒト抗体産生ハイブリドーマが得られることが示された。得られたヒト抗体は HIV やメラノーマなどの治療等への利用が期待される。

（実施例 110）ヒト 14 番染色体部分断片及びヒト 2 番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、軽鎖欠損マウスからの糖鎖抗原（asialo-GM1）に対する完全ヒト抗体産生ハイブリドーマの取得

（実施例 85）で作製された Tc マウス HK232 に対して、asialo-GM1 による免疫を行った。アジュバント（MPL+TDM Emulsion、RIBI Immunochem Research Inc.、R-700）を 2ml のクロロホルム・メタノール（2:1）に溶解した。2ml のクロロホルム・メタノール（2:1）に溶解した 1mg の asialo-GM1（ISOSEP AB、65/12）と混合した。混合溶液をナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレータにて乾燥させた。PBS を 2ml 添加した後 Vortex ミキサーを用いて激しく攪拌し、懸濁液を調製した（Gg4-RIBI）。その 0.2ml をマウス腹腔に 500 $\mu$ g の抗マウス CD40 抗体とともに免疫した。1 週間後に採血し、（実施例 84）に従い ELISA により抗体価の上昇を確認した。免疫 2 週後に懸濁液（Gg4-RIBI）を腹腔に最終免疫し、同時に 5 $\mu$ g の組換えヒト IL-6 を皮下に注射した。最終免疫 3 日後に脾臓を取り出し、（実施例 24）に従い細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。96well プレートを用いて G418 あるいは G418 と puromycin 存在下で選択培養し、その培養液中の抗体を（実施例 84）に従い ELISA にてスクリーニングした。また 0.15mg の asialo-GM1 と 1.5mg の Galactocerebroside と 1.5mg の cholesterol を 2ml のクロロホルム・メタノール（2:1）に溶解し乾燥した後、100ml の PBS に再懸濁し ELISA プレートに 1well 当たり 100 $\mu$ l 分注し固相化した。作製したプレートを使用して ELISA によるスクリーニングを行った。以上 2 種類のスクリーニングで陽性を示し

た well の細胞をクローニングした。抗 asialo-GM1 ヒト IgM 抗体産生ハイブリドーマ培養上清を HIV 感染細胞と反応させフローサイトメトリーにより解析した結果、HIV 非感染細胞に比べ HIV 感染細胞により結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 1 クローンを得た。

以上の結果より本ダブル Tc マウスにおいて糖鎖抗原である Asialo-GM1 に対する完全ヒト抗体産生ハイブリドーマが得られることが示された。得られたヒト抗体は HIV などの治療等への利用が期待される。

(実施例 111) ヒト 14 番染色体部分断片及びヒト 2 番染色体部分断片を保持する内在性抗体重鎖、軽鎖欠損マウスからのヒト TNF- $\alpha$  に対する完全ヒト抗体産生ハイブリドーマの取得

(実施例 85) で作製された 8 週齢の Tc マウス HK492 に対して、(実施例 84) (実施例 85) の方法に従い、ヒト TNF- $\alpha$  を免疫しハイブリドーマを作製した。PBS に溶解した TNF- $\alpha$  溶液を同量のアジュバント (Titer Max Gold、CytRx) と混合し 1 匹当たり 25  $\mu$ g 免疫した。約 80 日間にわたって 2 から 3 週間間隔で免疫を行った結果、抗体濃度が上昇確認されたため、TNF- $\alpha$  溶液のみを腹腔に最終免疫し、(実施例 86) に従ってハイブリドーマを作製した。抗体陽性ウェルの細胞をクローニングし、抗 TNF- $\alpha$  ヒト IgG/ $\kappa$  抗体産生ハイブリドーマを 1 クローン得た。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、単一または複数の外来染色体またはその断片を保持し、該染色体またはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物が提供された。本発明のキメラ非ヒト動物を利用して、生物学的に活性な物質を製造することができる。

本発明により、単一または複数の外来染色体またはその断片を保持し、該

染色体またはその断片上の遺伝子を発現する分化多能性を持つ細胞が提供された。該細胞を利用して、骨髓移植等による遺伝病治療を行うことができる。

本発明により、少なくとも２種の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞が提供された。破壊された内因性遺伝子と同じまたは相同の遺伝子を含む単一または複数の外来染色体あるいはその断片を移入させる受容細胞として本発明の細胞を利用することにより、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現する機能細胞あるいはキメラ非ヒト動物を作製することができる。かかるキメラ非ヒト動物またはその子孫の個体、組織または細胞において、単一または複数の外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現させることにより、その産物としての生物学的に活性な物質を製造することができる。

また、本発明により、染色体あるいはその断片を人為的に改変する方法が提供された。

## 請 求 の 範 囲

1. 改変された外来染色体あるいはその断片を保持する細胞の作製方法であって、下記の工程：

(a) 外来染色体あるいはその断片を含むミクロセルを作製し、該ミクロセルとの融合により相同組換え効率の高い細胞へ前記外来染色体あるいはその断片を移入させる工程、

(b) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片の所望の部位、及び／又は前記相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の所望の部位に相同組換えによりターゲティングベクターを挿入することにより、前記所望の部位にマーキングを施す工程、および

(c) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片のマーキングを施した部位における欠失および／または転座を生ぜしめる工程

を含む前記方法。

2. 工程 (a) および (b) を経た複数の相同組換え効率の高い細胞を全細胞融合した後、工程 (c) を行う請求項 1 記載の方法。

3. 複数の相同組換え効率の高い細胞が、異なる外来染色体あるいはその断片を保持するものである請求項 2 記載の方法。

4. 改変された外来染色体あるいはその断片を保持する細胞が動物細胞である請求項 1 記載の方法。

5. 動物細胞が哺乳動物細胞である請求項 4 記載の方法。

6. 動物細胞がヒト以外の動物の細胞である請求項 4 記載の方法。

7. ターゲティングベクターがテロメア配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記テロメア配列が所望の部位に導入される請求項 1 記載の方法。

8. テロメア配列の導入された部位に欠失を生ぜしめる請求項 2 記載の方法。

9. ターゲティングベクターが部位特異的組換え酵素の認識配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記部位特異的組換え酵素の認

- 識配列が所望の部位に導入される請求項1記載の方法。
10. 部位特異的組換え酵素の認識配列を含むターゲティングベクターの挿入と同時にあるいは挿入後に、部位特異的組換え酵素を発現できるベクターを相同組換え効率の高い細胞に導入し、前記部位特異的組換え酵素活性を発現せしめることにより、部位特異的組換え酵素の認識配列が導入された部位において外来染色体あるいはその断片の欠失および／または転座を生ぜしめる請求項9記載の方法。
  11. 転座が、複数の外来染色体あるいはその断片の間で行われるものである請求項10記載の方法。
  12. 複数の外来染色体が、同種の生物由来である請求項11記載の方法。
  13. 同種の生物がヒトである請求項12記載の方法。
  14. 複数の外来染色体が、異種の生物由来である請求項11記載の方法。
  15. 異種の生物がヒトおよびマウスである請求項14記載の方法。
  16. 転座が、外来染色体あるいはその断片と相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の間で行われるものである請求項10記載の方法。
  17. 部位特異的組換え酵素がCre酵素である請求項9記載の方法。
  18. 部位特異的組換え酵素の認識配列がLoxP配列である請求項9記載の方法。
  19. 相同組換え効率の高い細胞が胚性幹細胞（ES細胞）である請求項1記載の方法。
  20. 相同組換え効率の高い細胞がニワトリDT-40細胞である請求項1記載の方法。
  21. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞を選抜する工程をさらに含む請求項1記載の方法。
  22. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞の選抜が、マーカー遺伝子の発現に基づくものである請求項21記載の方法。
  23. マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子である請求項22記載の方法。
  24. マーカー遺伝子がオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein）遺伝子あるいはその改変体遺伝子である請求項22



記載の方法。

25. 外来染色体あるいはその断片がヒト由来である請求項1記載の方法。

26. 改変された外来染色体あるいはその断片を保持するキメラ非ヒト動物の作製方法であって、下記の工程；

(a) 外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により相同組換え効率の高い細胞へ前記外来染色体あるいはその断片を移入させる工程、

(b) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片の所望の部位、及び／又は前記相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の所望の部位に相同組換えによりベクターを挿入することにより、前記所望の部位にマーキングを施す工程、

(c) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片のマーキングを施した部位における欠失および／または転座を生ぜしめる工程、および

(d) 前記の欠失または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記の欠失または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を分化多能性を保持する非ヒト動物細胞に移入させる工程を含む前記方法。

27. 工程(a)および(b)を経た複数の相同組換え効率の高い細胞を全細胞融合した後、工程(c)を行う請求項26記載の方法。

28. 複数の相同組換え効率の高い細胞が、異なる外来染色体あるいはその断片を保持するものである請求項27記載の方法。

29. ターゲティングベクターがテロメア配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記テロメア配列が所望の部位に導入される請求項26記載の方法。

30. テロメア配列の導入された部位に欠失を生ぜしめる請求項29記載の方法。

31. ターゲティングベクターが部位特異的組換え酵素の認識配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記部位特異的組換え酵素の認識配列が所望の部位に導入される請求項26記載の方法。

32. 部位特異的組換え酵素の認識配列を含むターゲティングベクターの

挿入と同時にあるいは挿入後に、部位特異的組換え酵素を発現できるベクターを相同組換え効率の高い細胞に導入し、前記部位特異的組換え酵素活性を発現せしめることにより、部位特異的組換え酵素の認識配列が導入された部位において外来染色体あるいはその断片の欠失および／または転座を生ぜしめる請求項31記載の方法。

33. 転座が、複数の外来染色体あるいはその断片の間で行われるものである請求項32記載の方法。

34. 転座が、外来染色体あるいはその断片と相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の間で行われるものである請求項32記載の方法。

35. 部位特異的組換え酵素が Cre 酵素である請求項31記載の方法。

36. 部位特異的組換え酵素の認識配列が LoxP 配列である請求項31記載の方法。

37. 相同組換え効率の高い細胞が胚性幹細胞（ES細胞）である請求項26記載の方法。

38. 相同組換え効率の高い細胞がニワトリDT-40細胞である請求項26記載の方法。

39. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞を選抜する工程をさらに含む請求項26記載の方法。

40. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞の選抜が、マーカー遺伝子の発現に基づくものである請求項39記載の方法。

41. マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子である請求項40記載の方法。

42. マーカー遺伝子がオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein）遺伝子あるいはその改変体遺伝子である請求項40記載の方法。

43. 工程（d）において、相同組換え効率の高い細胞からマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片をCHO細胞に移入し、次いで、該CHO細胞からマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を分化多能性を保持す

る細胞に移入させる請求項26記載の方法。

44. 分化多能性を有する細胞が胚性幹細胞（ES細胞）である請求項26記載の方法。

45. 外来染色体あるいはその断片がヒト由来である請求項26記載の方法。

46. 改変された外来染色体あるいはその断片を保持する非ヒト動物の作製方法であって、下記の工程；

（a）外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により相同組換え効率の高い細胞へ前記外来染色体あるいはその断片を移入させる工程、

（b）前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片の所望の部位、及び／又は前記相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の所望の部位に相同組換えによりベクターを挿入することにより、前記所望の部位にマーキングを施す工程、

（c）前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片のマーキングを施した部位における欠失および／または転座を生ぜしめる工程、

（d）前記の欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記の欠失または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を非ヒト動物由来の細胞に移入させる工程、および

（e）前記非ヒト動物由来の細胞の核を、同種の非ヒト動物の除核した未受精卵に移植する工程

を含む前記方法。

47. 工程（a）および（b）を経た複数の相同組換え効率の高い細胞を全細胞融合した後、工程（c）を行う請求項46記載の方法。

48. 複数の相同組換え効率の高い細胞が、異なる外来染色体あるいはその断片を保持するものである請求項47記載の方法。

49. ターゲティングベクターがテロメア配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記テロメア配列が所望の部位に導入される請求項46記載の方法。

50. ~~テロメア配列の導入された部位に欠失を生ぜしめる請求項49記載の方法。~~

51. ターゲティングベクターが部位特異的組換え酵素の認識配列を含み、該ターゲティングベクターの挿入により前記部位特異的組換え酵素の認識配列が所望の部位に導入される請求項46記載の方法。
52. 部位特異的組換え酵素の認識配列を含むターゲティングベクターの挿入と同時にあるいは挿入後に、部位特異的組換え酵素を発現できるベクターを相同組換え効率の高い細胞に導入し、前記部位特異的組換え酵素活性を発現せしめることにより、部位特異的組換え酵素の認識配列が導入された部位において外来染色体あるいはその断片の欠失および／または転座を生ぜしめる請求項51記載の方法。
53. 転座が、複数の外来染色体あるいはその断片の間で行われるものである請求項52記載の方法。
54. 転座が、外来染色体あるいはその断片と相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の間で行われるものである請求項52記載の方法。
55. 部位特異的組換え酵素がCre酵素である請求項51記載の方法。
56. 部位特異的組換え酵素の認識配列がLoxP配列である請求項51記載の方法。
57. 相同組換え効率の高い細胞が胚性幹細胞（ES細胞）である請求項46記載の方法。
58. 相同組換え効率の高い細胞がニワトリDT-40細胞である請求項46記載の方法。
59. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞を選抜する工程をさらに含む請求項46記載の方法。
60. 欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を含む細胞の選抜が、マーカー遺伝子の発現に基づくものである請求項59記載の方法。
61. マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子である請求項60記載の方法。
62. マーカー遺伝子がオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein）遺伝子あるいはその改変体遺伝子である請求項60記載の方法。
63. 工程（d）において、相同組換え効率の高い細胞からミクロセルを作

製し、該マイクロセルとの融合により、前記欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片をCHO細胞に移入し、次いで、該CHO細胞からマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記欠失および／または転座を生じた外来染色体あるいはその断片を非ヒト動物由来の細胞に移入させる請求項46記載の方法。

64. 非ヒト動物由来の細胞が、胚または胚盤胞由来の培養細胞である請求項46記載の方法。

65. 非ヒト動物由来の細胞が、胎児または成体由来の培養細胞である請求項46記載の方法。

66. 非ヒト動物由来の細胞が、胎児由来の繊維芽細胞である請求項46記載の方法。

67. 外来染色体あるいはその断片がヒト由来である請求項46記載の方法。

68. 外来染色体あるいはその断片の欠失により生じた染色体断片を保持する非ヒト動物。

69. 欠失により生じた染色体断片が、

(i) マーカー遺伝子およびテロメア配列、および／または

(ii) 部位特異的組換え酵素の認識配列

を有するものである請求項68記載の非ヒト動物。

70. 複数の外来染色体あるいはその断片の間の転座により生じた組換え外来染色体を保持する非ヒト動物。

71. 組換え外来染色体が、

(i) マーカー遺伝子およびテロメア配列、および／または

(ii) 部位特異的組換え酵素の認識配列

を有するものである請求項70記載の非ヒト動物。

72. 組換え外来染色体の保持が、非ヒト動物細胞の核内において独立したものである請求項70記載の非ヒト動物。

73. 組換え外来染色体がヒト由来である請求項70記載の非ヒト動物。

74. 組換え外来染色体がヒト14番染色体とヒト2番染色体由来である請求項70記載の非ヒト動物。

75. 組換え外来染色体がヒト14番染色体とヒト22番染色体由来である請求項70記

載の非ヒト動物。

76. 組換え外来染色体がヒト抗体重鎖遺伝子と軽鎖 $\lambda$ 遺伝子を含む請求項70記載の非ヒト動物。

77. 組換え外来染色体がヒト抗体重鎖遺伝子と軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む請求項70記載の非ヒト動物。

78. マウスである請求項70記載の非ヒト動物。

79. 有蹄類である請求項70記載の非ヒト動物。

80. ウシである請求項70記載の非ヒト動物。

81. ヒツジである請求項70記載の非ヒト動物。

82. 鳥類である請求項70記載の非ヒト動物。

83. ニワトリである請求項70記載の非ヒト動物。

84. 染色体あるいはその断片の欠失および／または転座により生じた組換え染色体あるいは染色体断片であって、

(i) マーカー遺伝子およびテロメア配列、および／または

(ii) 部位特異的組換え酵素の認識配列

が導入され、かつ、ヒト染色体の少なくとも一部の領域を含む前記組換え染色体あるいは染色体断片を保持する細胞。

85. 細胞中で外来染色体あるいはその断片を改変する方法であって、下記の工程：

(a) 外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により相同組換え効率の高い細胞へ前記外来染色体あるいはその断片を移入させる工程、

(b) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片の所望の部位、及び／又は前記相同組換え効率の高い細胞に由来する染色体の所望の部位に相同組換えによりターゲティングベクターを挿入することにより、前記所望の部位にマーキングを施す工程、および

(c) 前記相同組換え効率の高い細胞において、前記外来染色体あるいはその断片のマーキングを施した部位における欠失または転座を生ぜしめる工程

を含む前記方法。

86. ヒト 1 4 番あるいは 2 1 番染色体由来のセントロメア配列および部位特異的組換え酵素の認識配列を含む人工染色体ベクター。

87. 部位特異的組換え酵素の認識配列がLoxP配列である請求項86記載の人工染色体ベクター。

88. 染色体あるいはその断片の欠失および／または転座により生じた組換え染色体あるいは染色体断片であって、

(i) マーカー遺伝子およびテロメア配列、および／または

(ii) 部位特異的組換え酵素の認識配列

が導入され、かつ、ヒト染色体の少なくとも一部の領域を含む前記組換え染色体あるいは染色体断片。

89. ヒト 1 4 番染色体断片およびヒト 2 2 番染色体断片を含む請求項88に記載の組換え染色体あるいは染色体断片。

90. ヒト 1 4 番染色体断片およびヒト 2 番染色体断片を含む請求項88記載の組換え染色体あるいは染色体断片。

91. ヒト抗体重鎖遺伝子およびヒト抗体軽鎖 $\lambda$ 遺伝子を含む請求項88記載の組換え染色体あるいは染色体断片。

92. ヒト抗体重鎖遺伝子およびヒト抗体軽鎖 $\kappa$ 遺伝子を含む請求項88記載の組換え染色体あるいは染色体断片。





マイクロセル融合株																
	B-5	B-24	C8他	D-1	D-2	D-8	D-14	E-21	I-23	L-34	M-16	N2他	T-9	W-23	Y-68	Z-15
S207	×	×	×	×	×	●	●	●	●	×	×	×	×	×	×	
多型性	×	×	×	×	×	●	●	●	●	●	×	×	●	×	×	
および	●	●	●	×	×	●	●	●	●	●	×	●	×	●	×	
遺伝子	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
マーカー	●	●	●	×	×	●	●	●	●	●	×	●	×	●	×	
S156	×	×	×	×	×	●	●	●	●	●	×	×	×	×	×	
S159	×	×	×	×	×	●	●	●	●	●	×	×	×	×	×	
染色体	独立	独立	転座		独立	独立	独立	独立	独立			転座		独立		独立

図 1



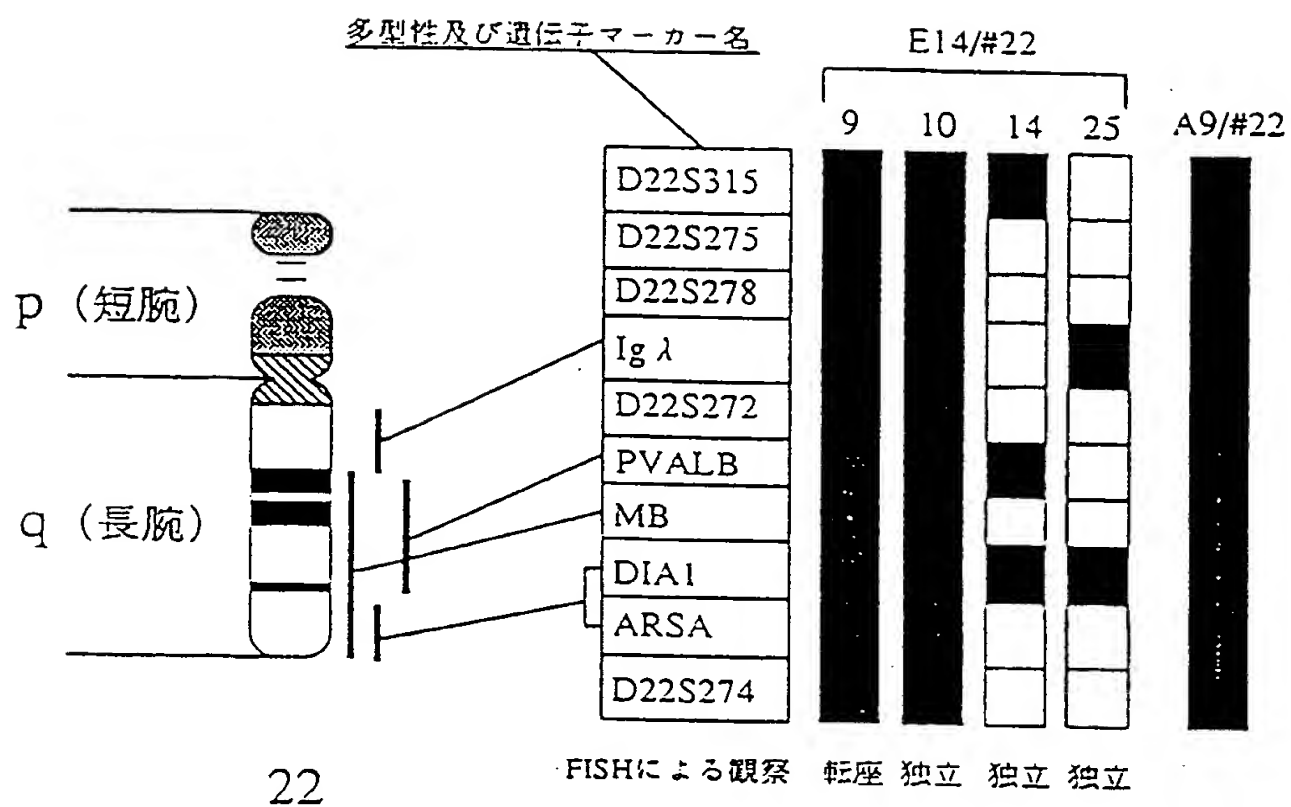


図 2



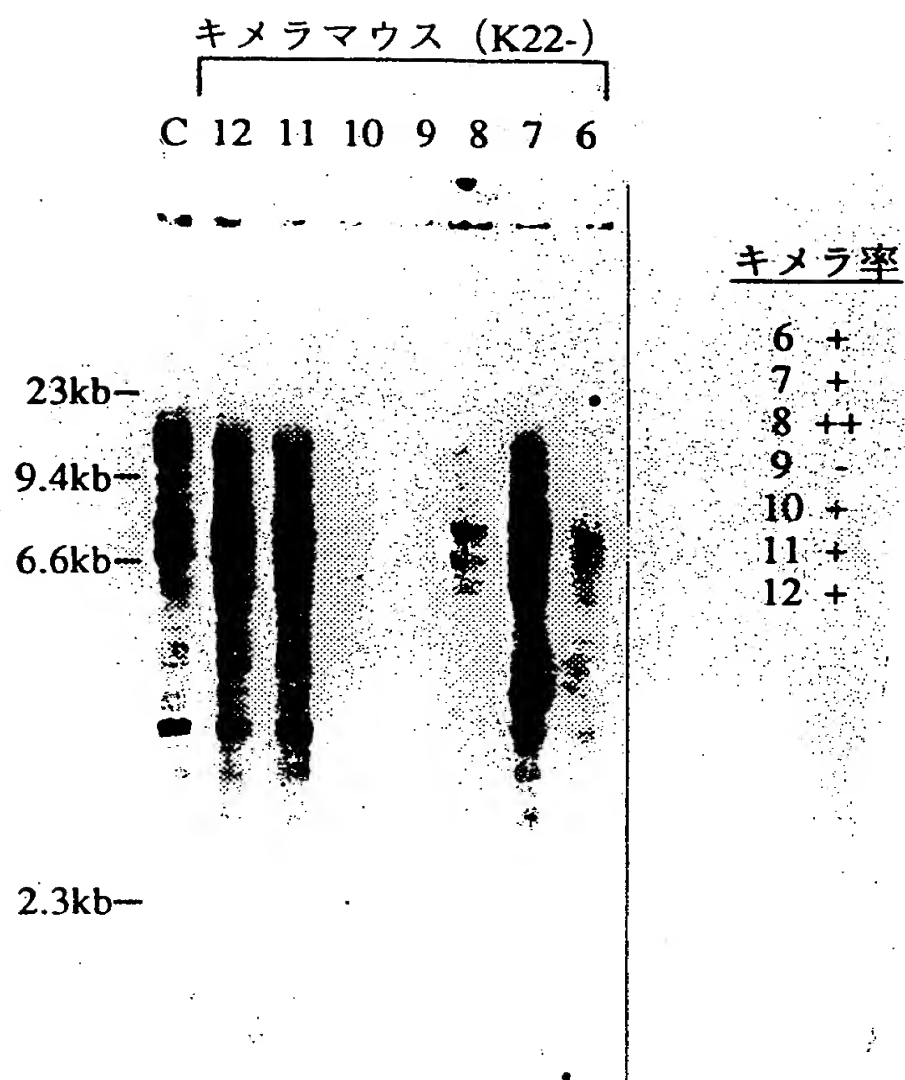
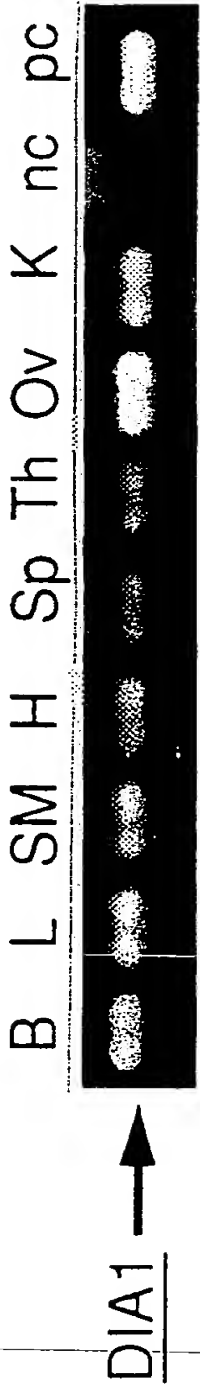


図 3



B : 脳  
L : 肝臓  
SM : 骨格筋  
H : 心臓  
Sp : ひ臓  
Th : 胸腺  
Ov : 卵巣  
K : 腎臓  
nc : 陰性コントロール  
pc : 陽性コントロール



DIA1 : ヒト-チトクローム b5 レダクターゼ





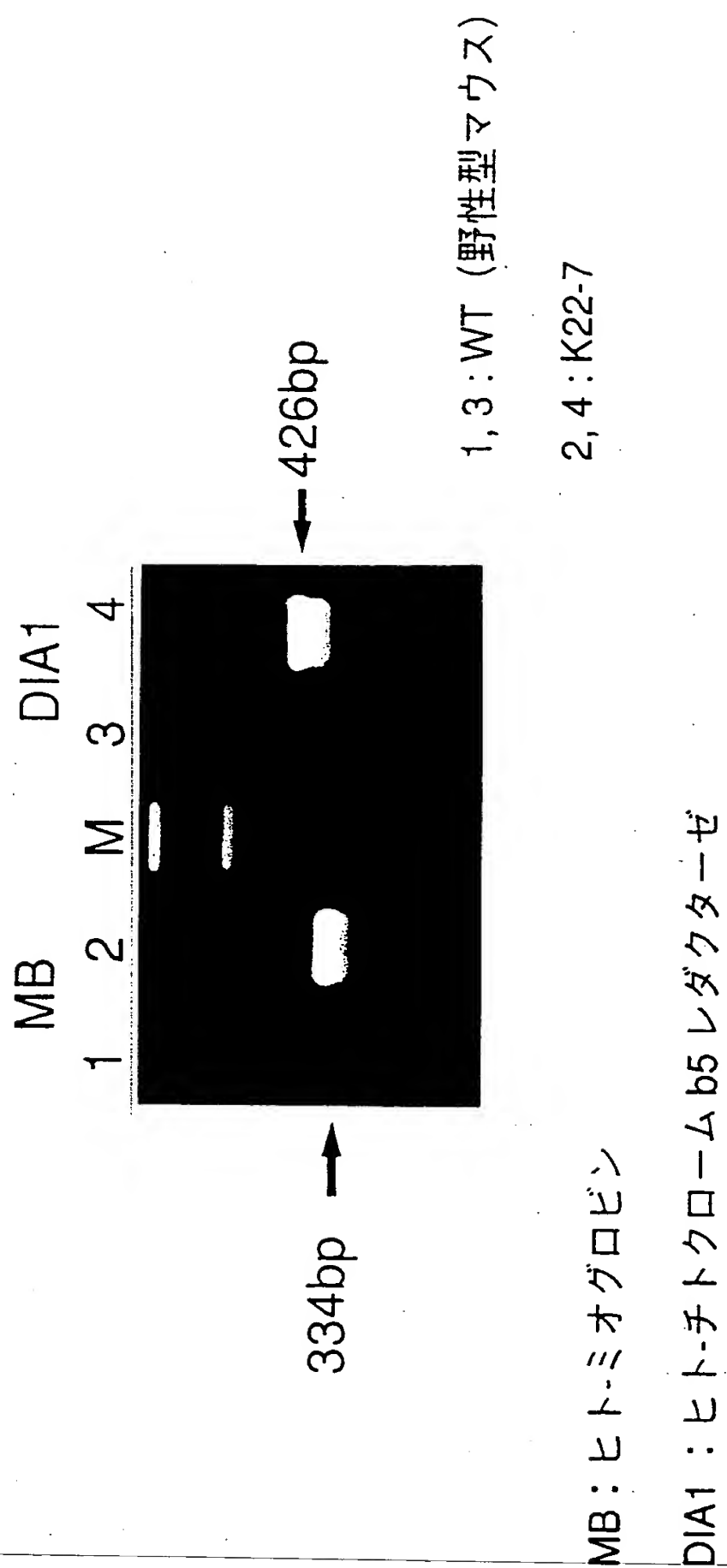
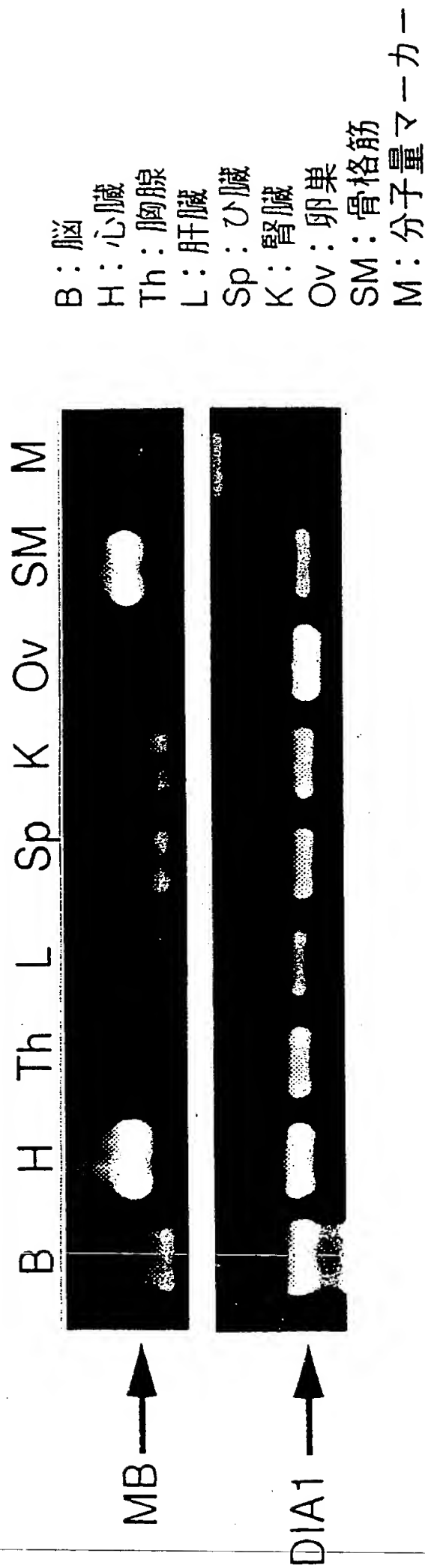


図 5





MB: ヒトミオグロビン

DIA1: ヒト-チトクローム b5 レダクターゼ

図 6



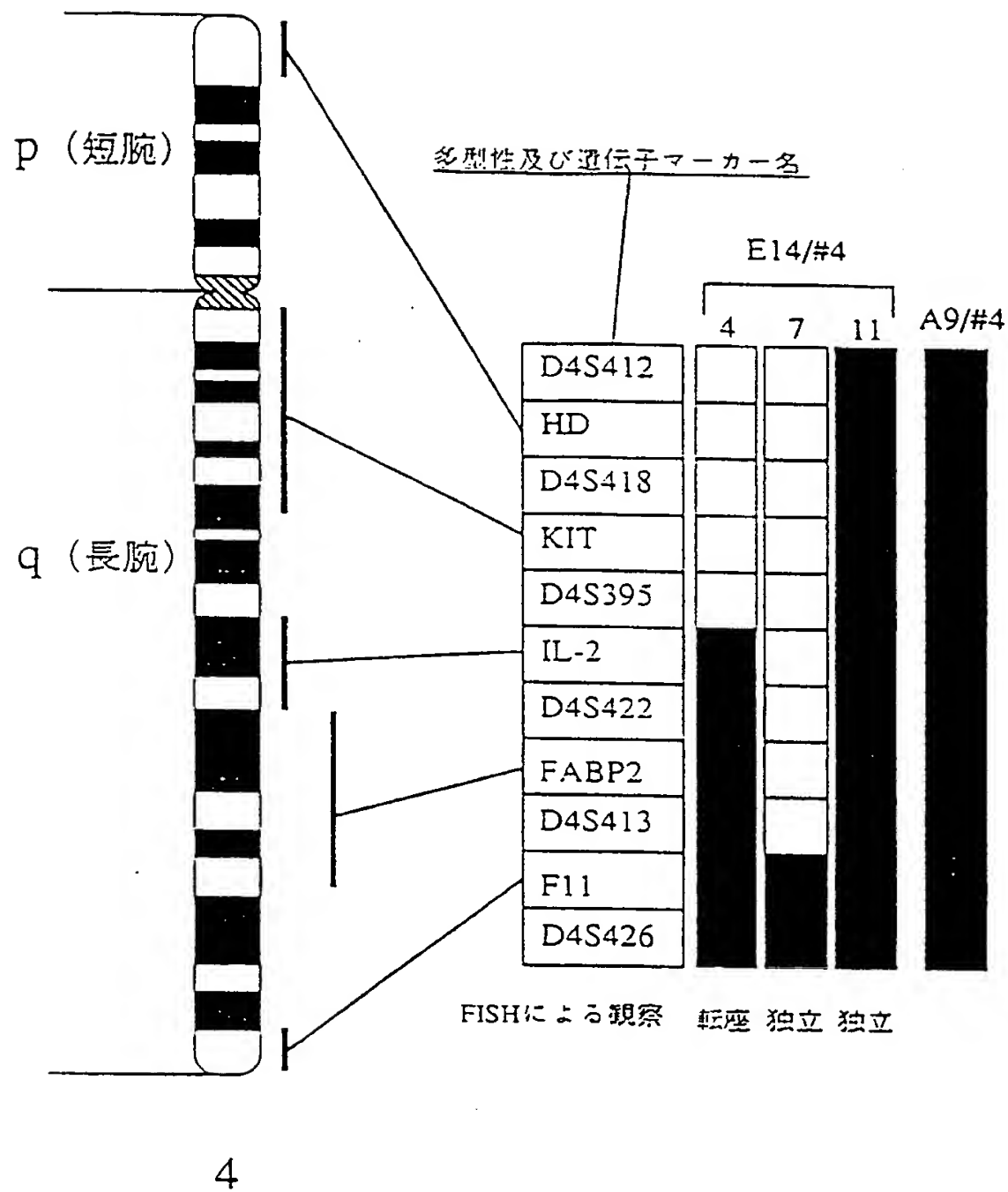


図 7



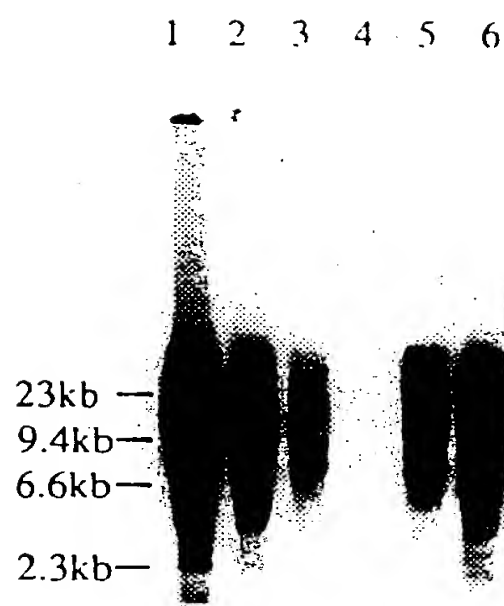


図 8





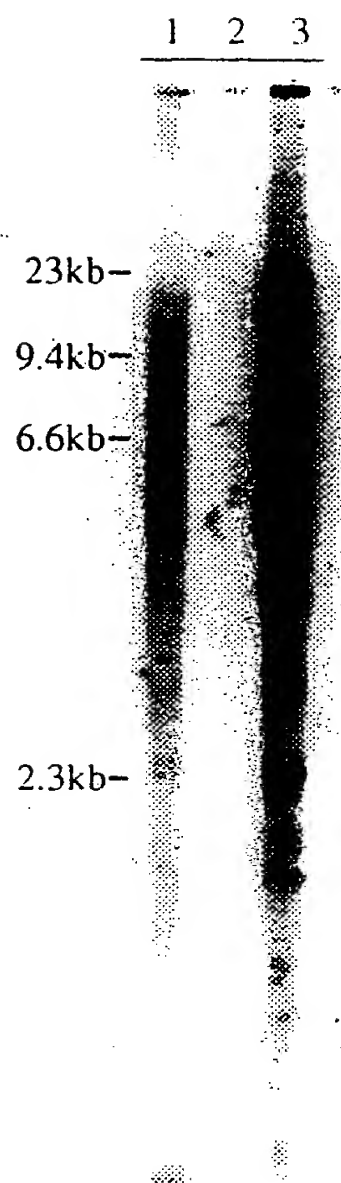


図 9



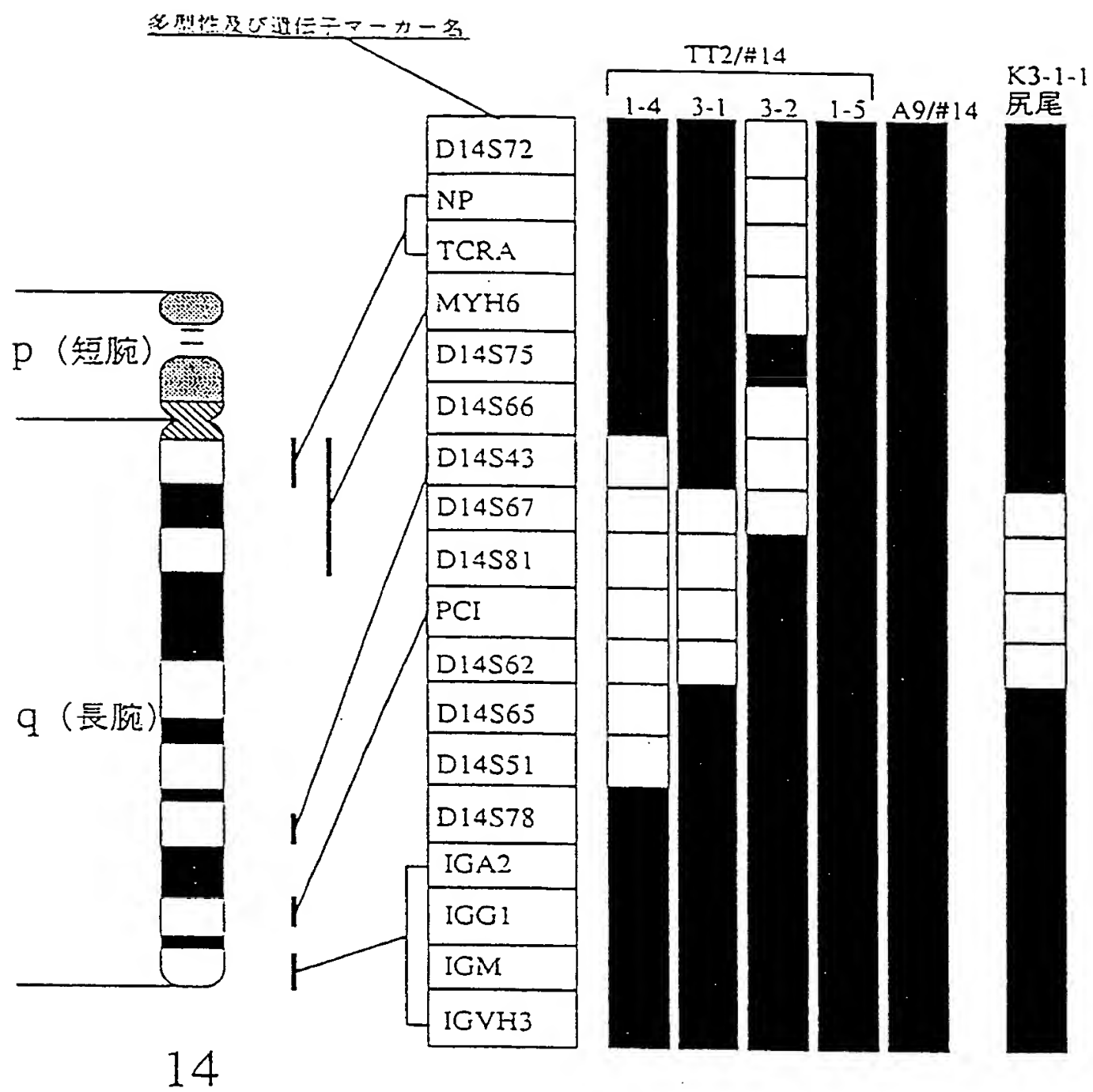
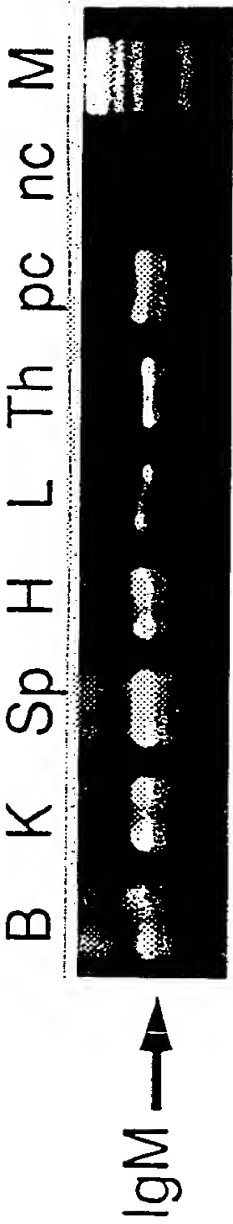


図 10



B: 脳  
K: 腎臓  
Sp: ひ臓  
H: 心臓  
L: 肝臓  
Th: 胸腺  
pc: 陽性コントロール  
nc: 陰性コントロール  
M: 分子量マーカー



IgM: ヒト-免疫グロブリン  $\mu$ 鎖

図 11



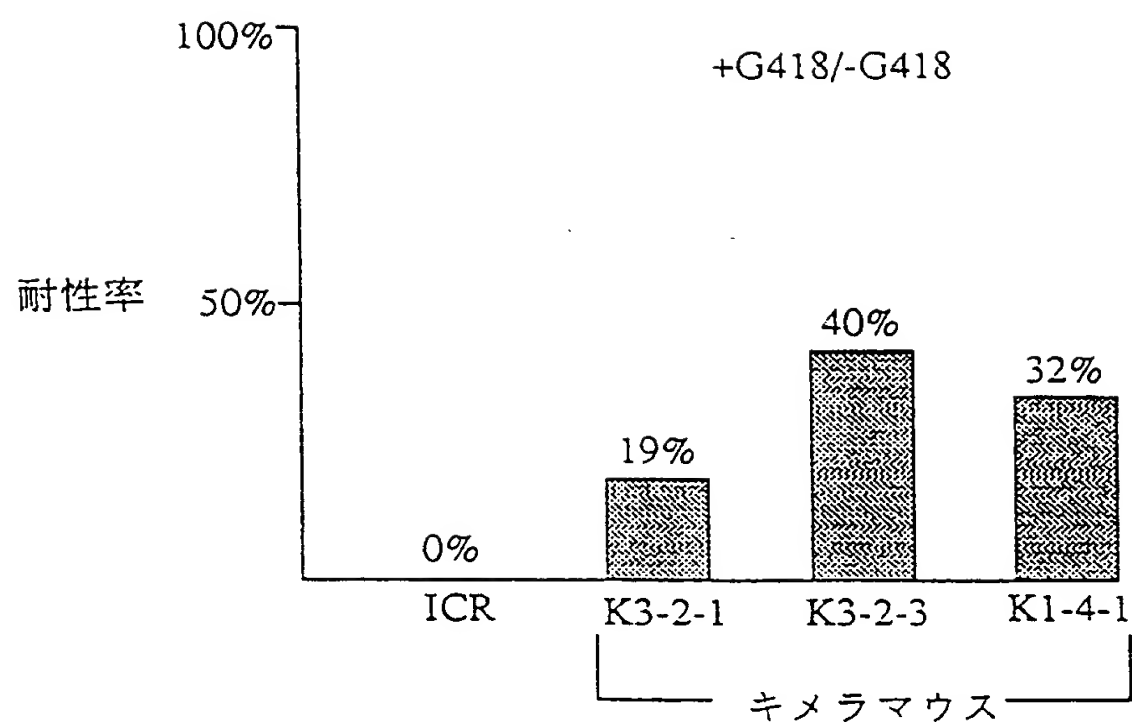


図 12





図 13

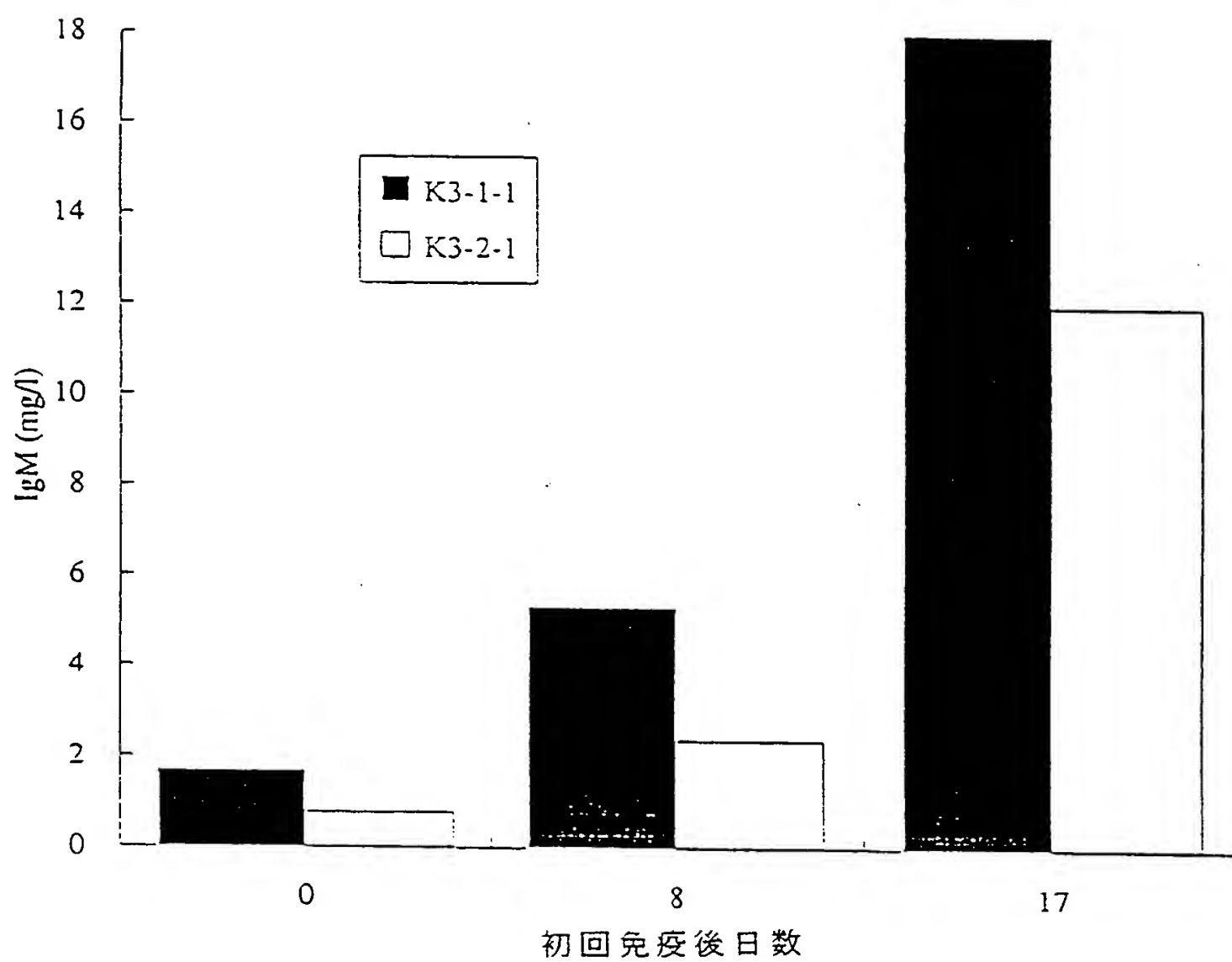




図 14

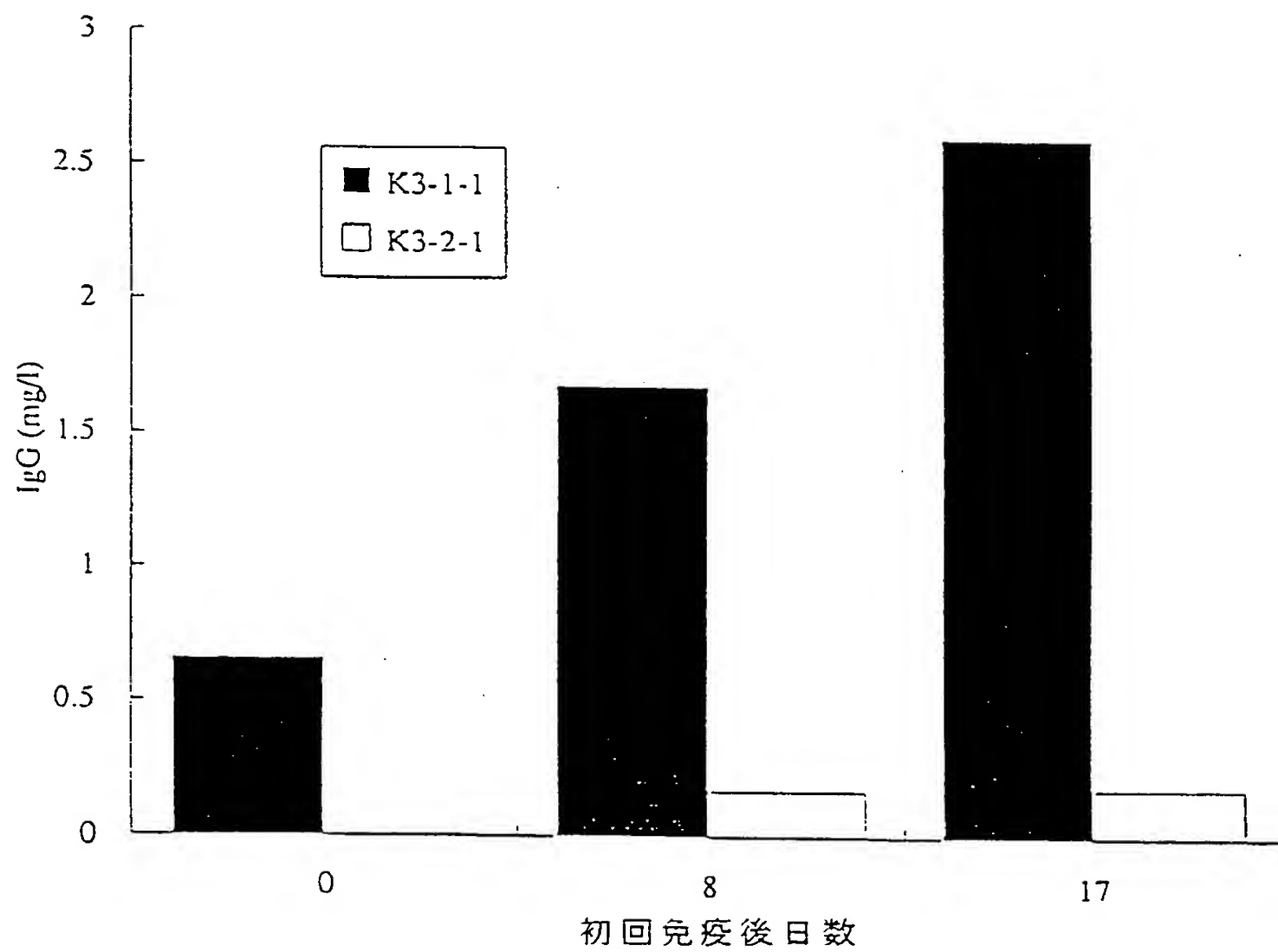
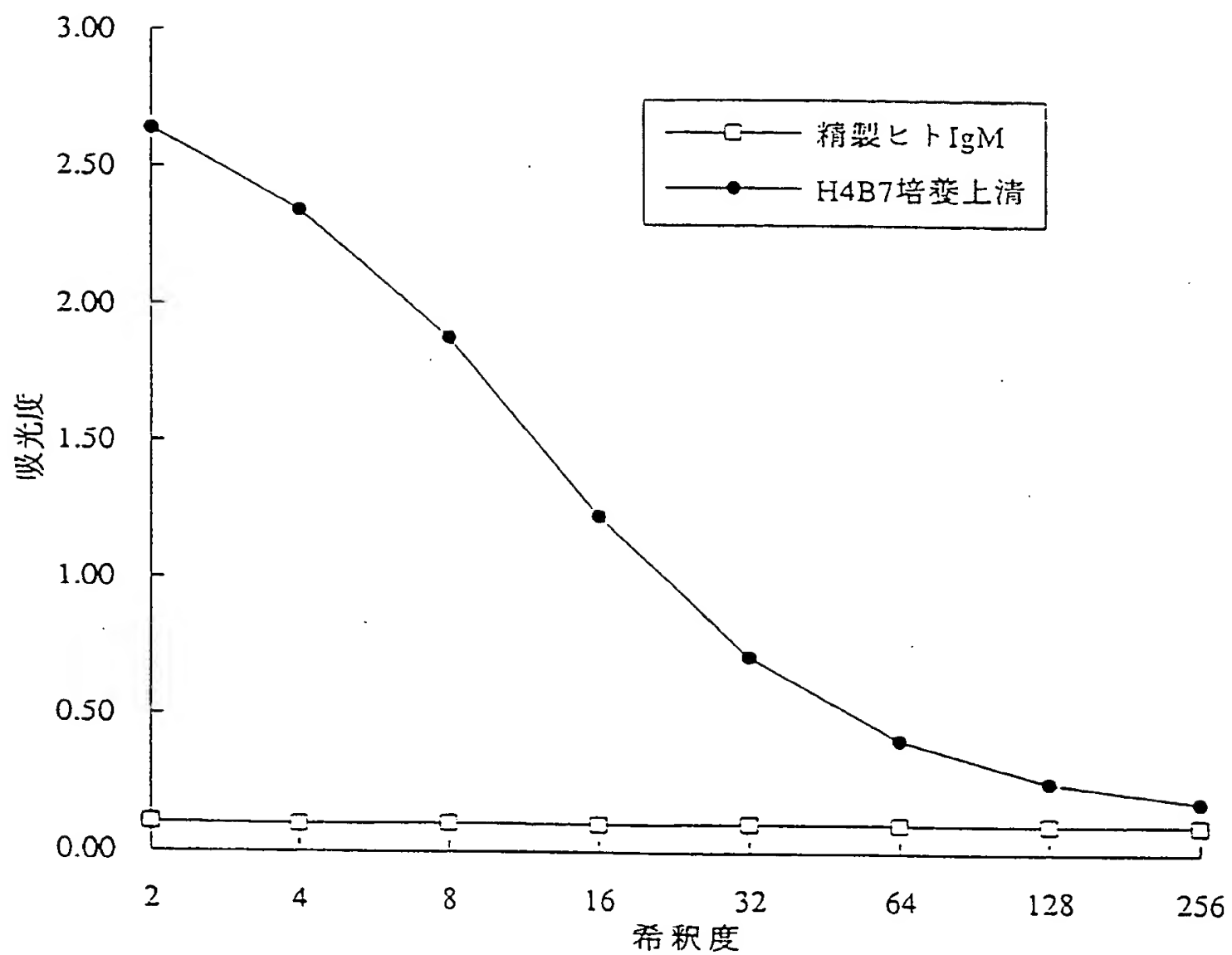




図 15





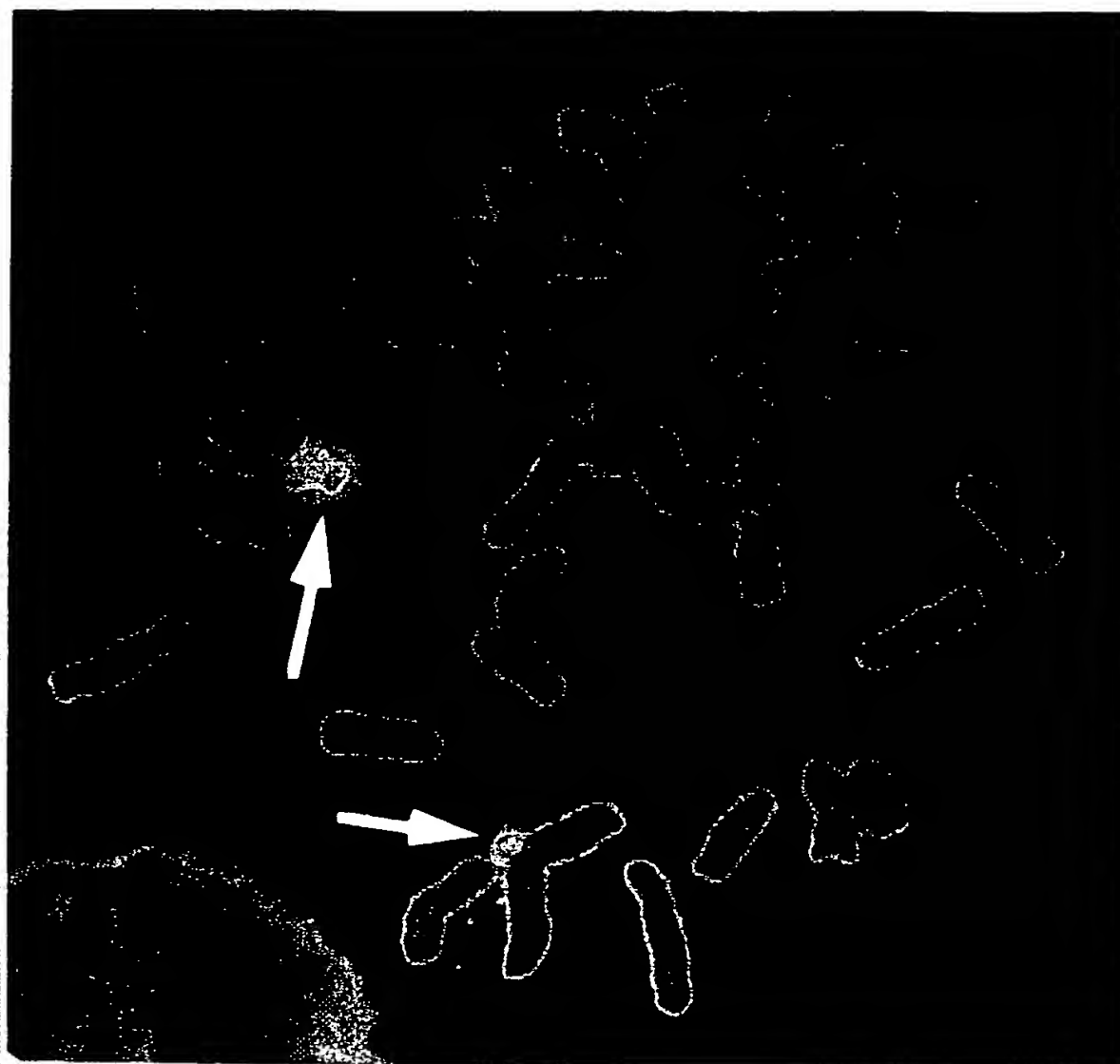


図 16





図 17

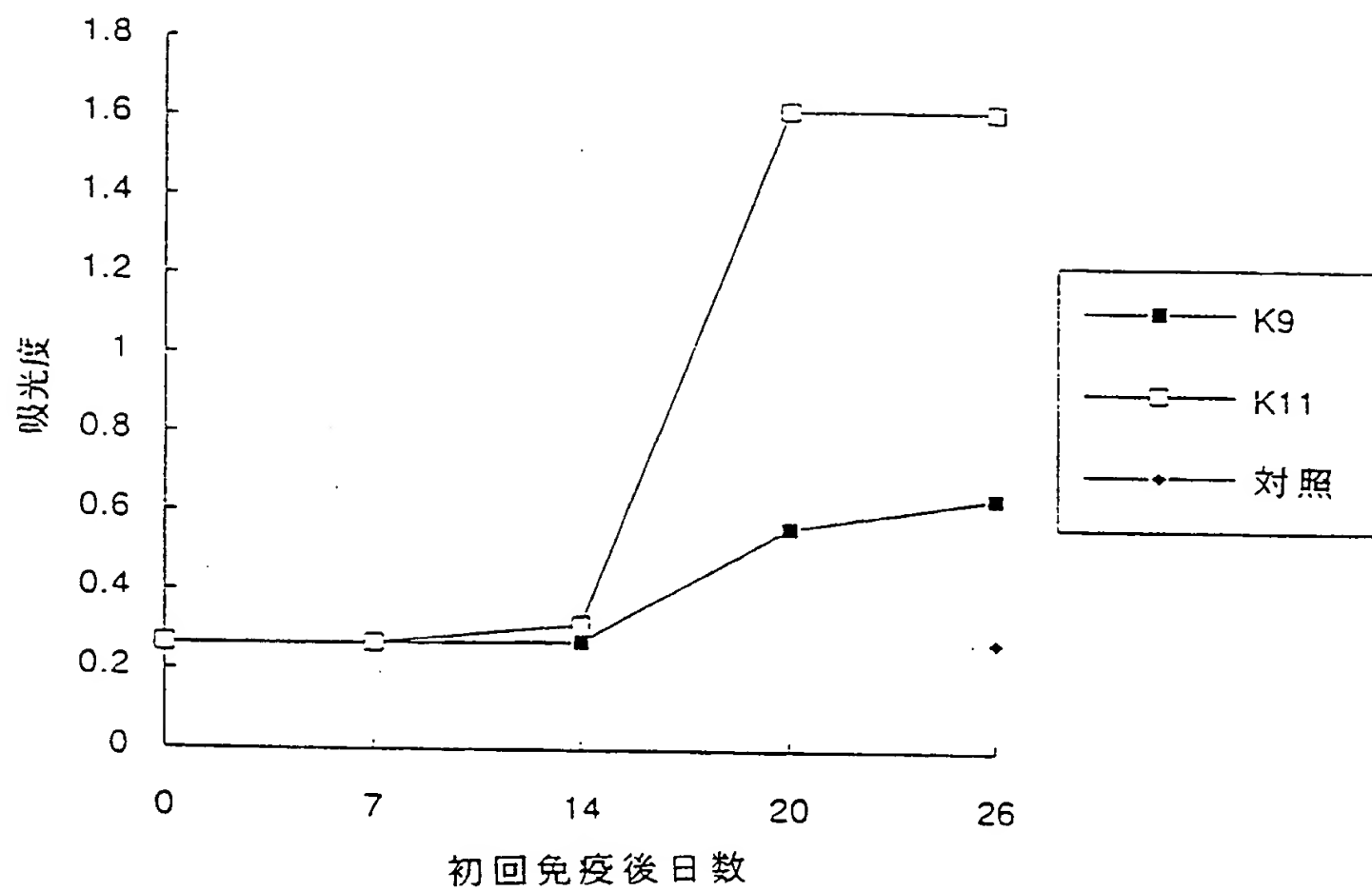




図 18

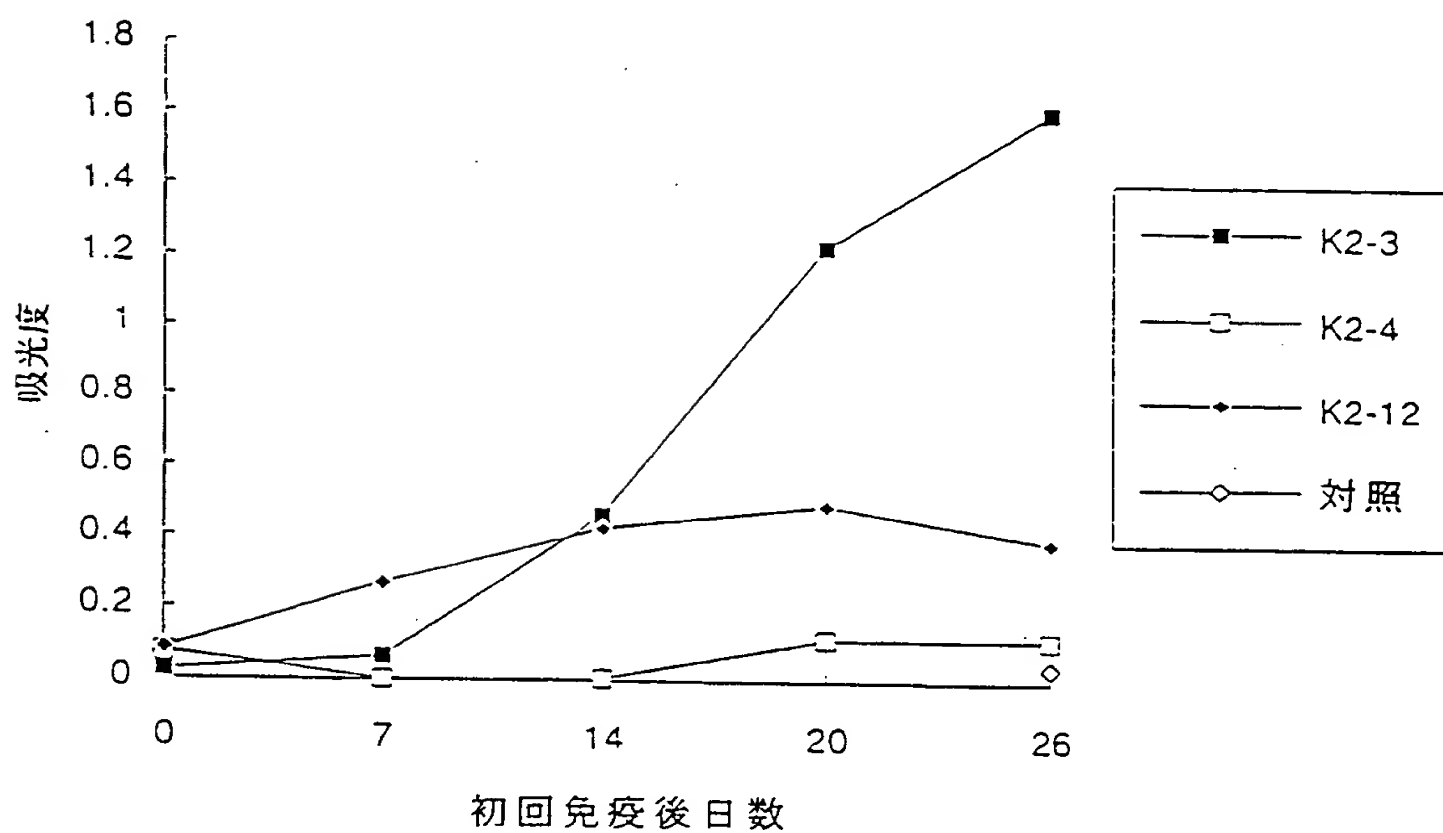




図 19

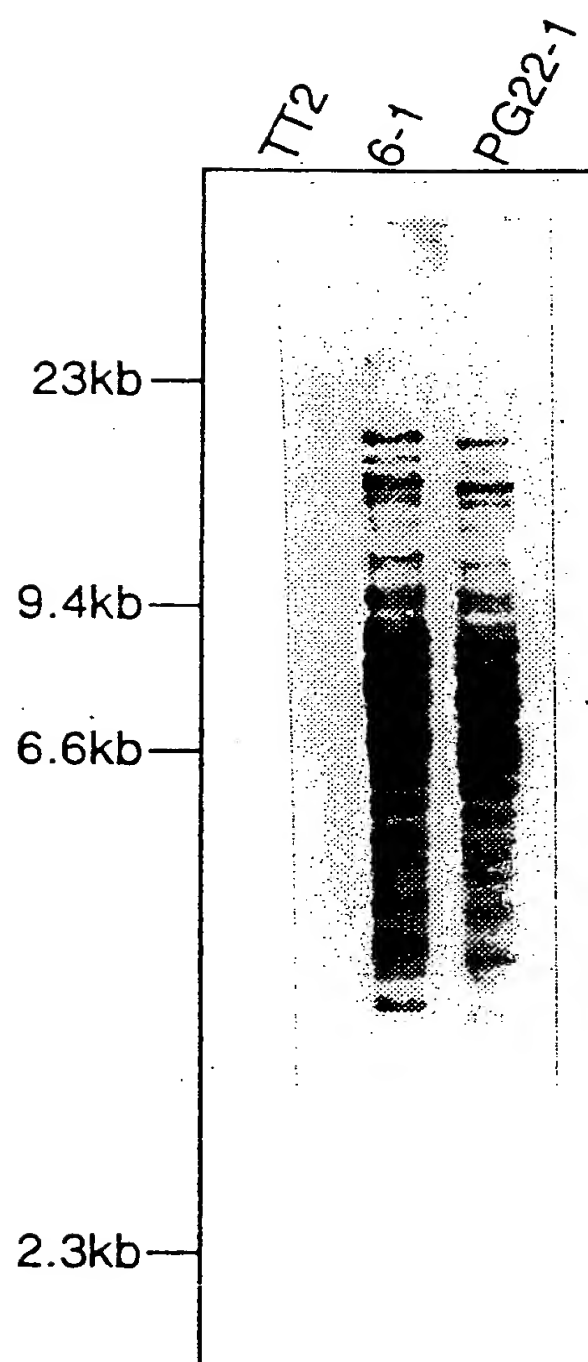
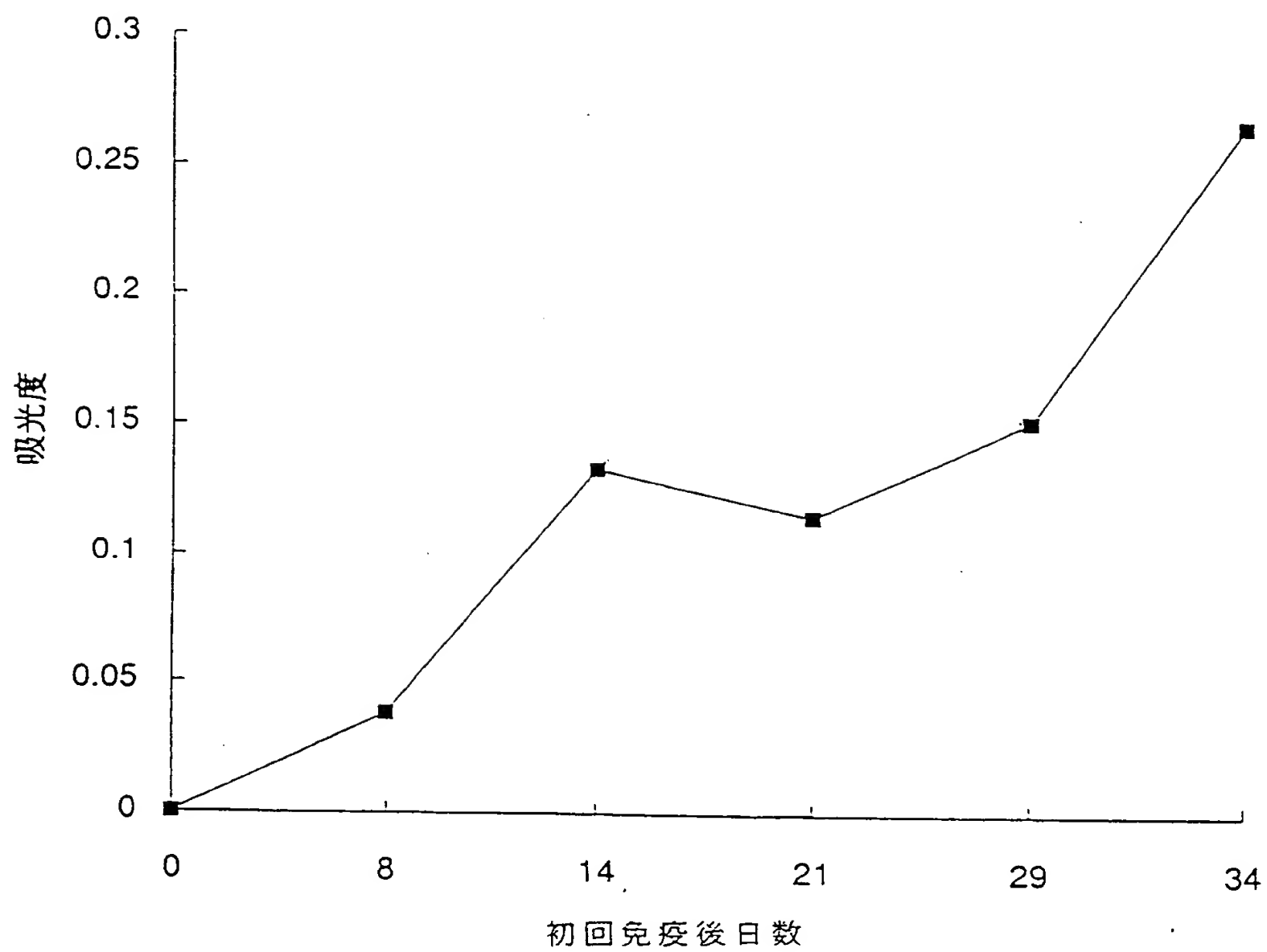




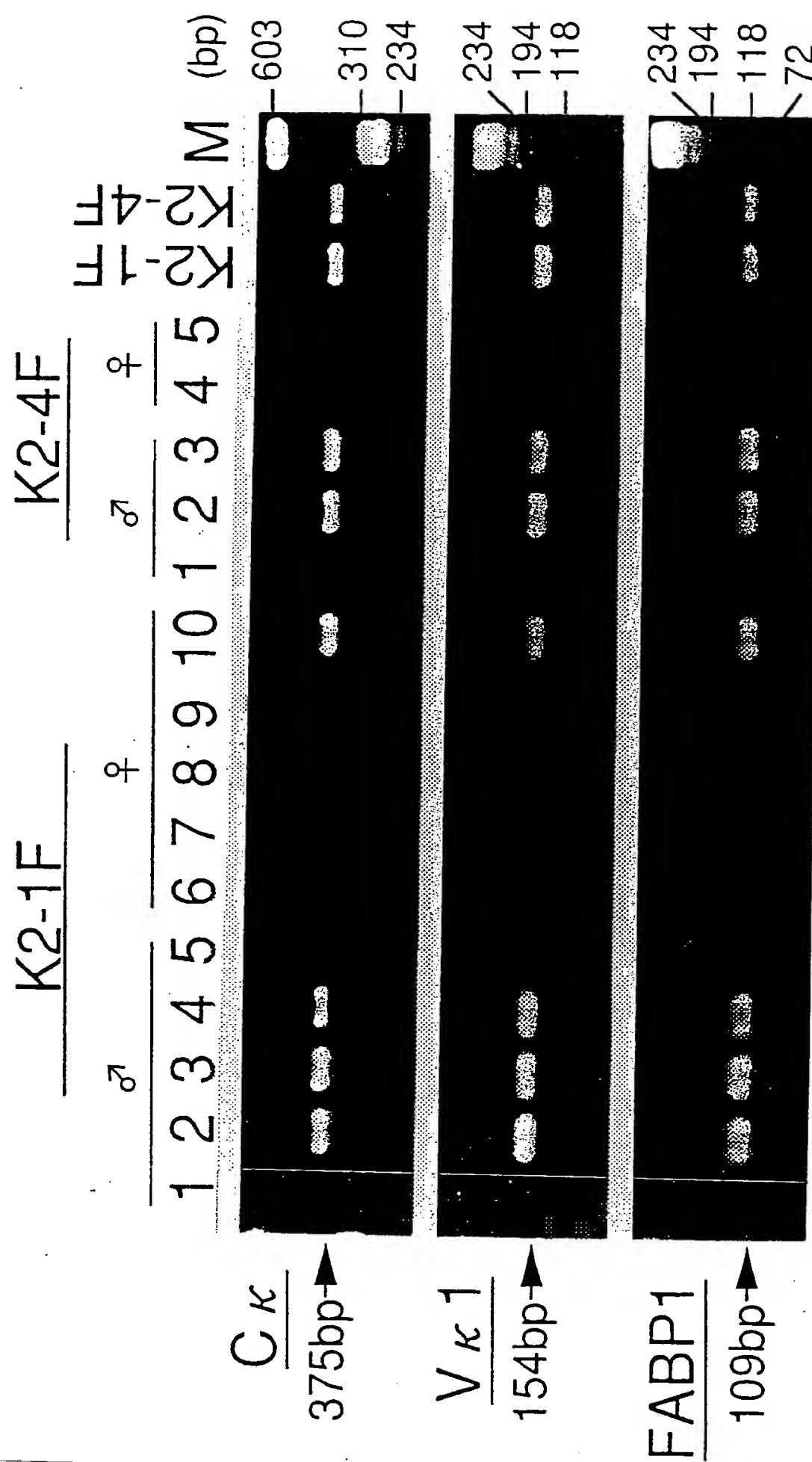
図 20







21





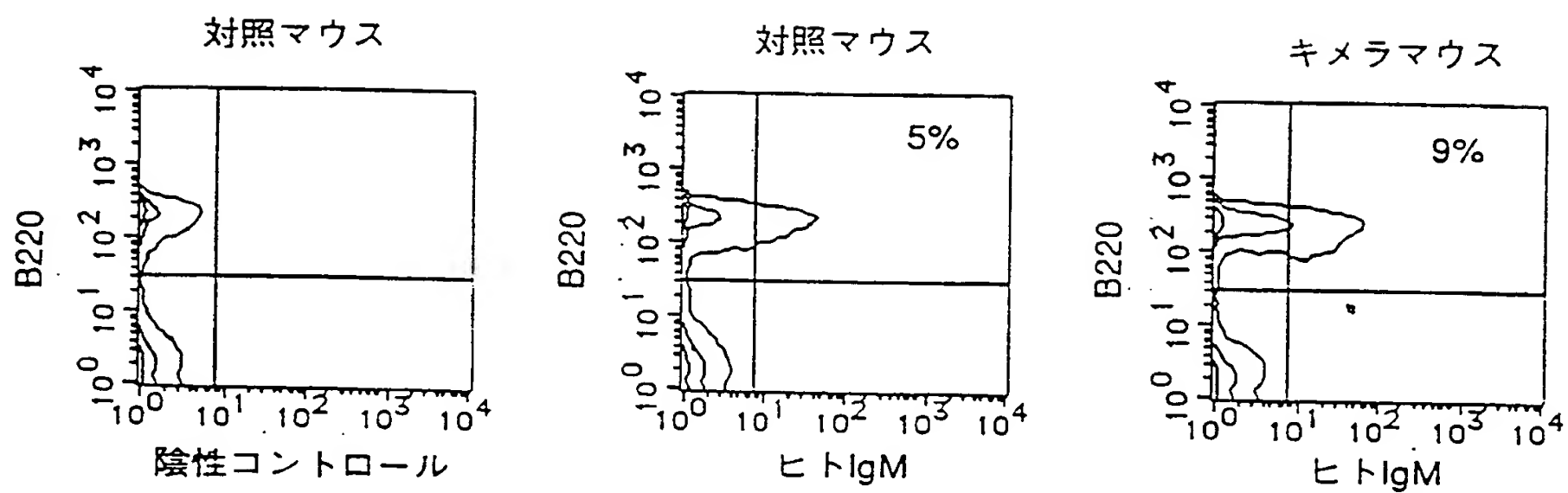


図 22



図 23

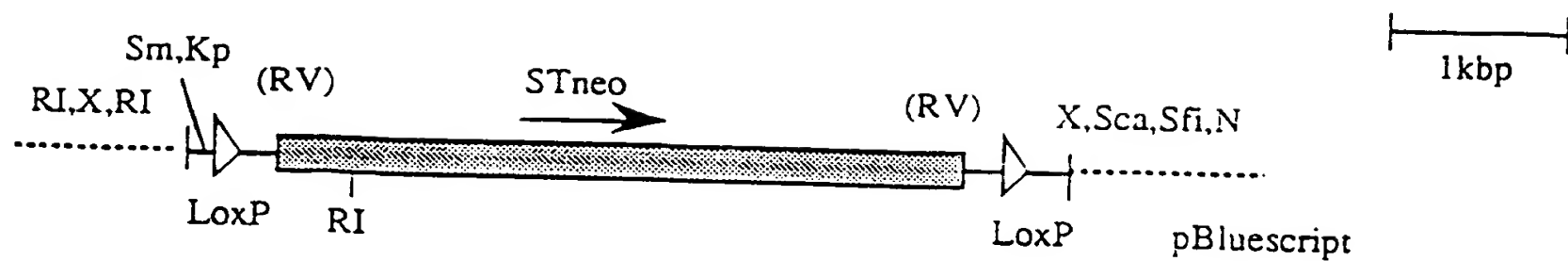


図 24

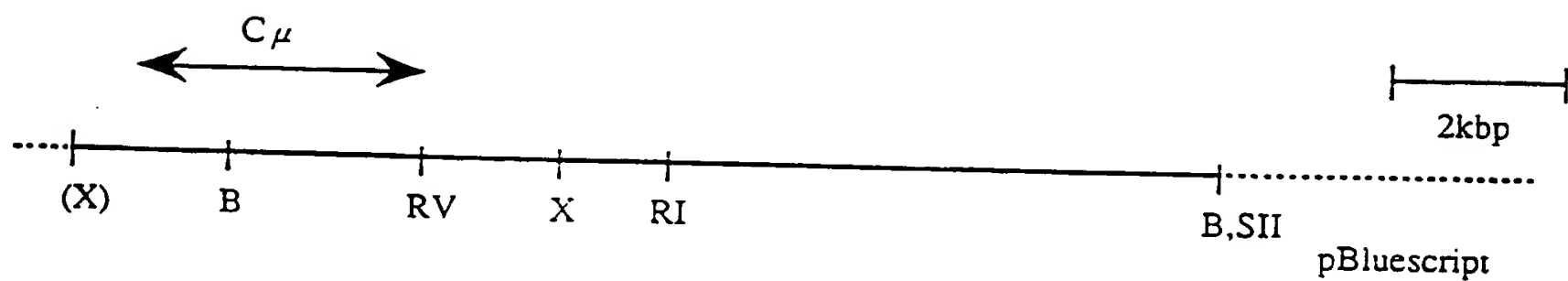


図 25

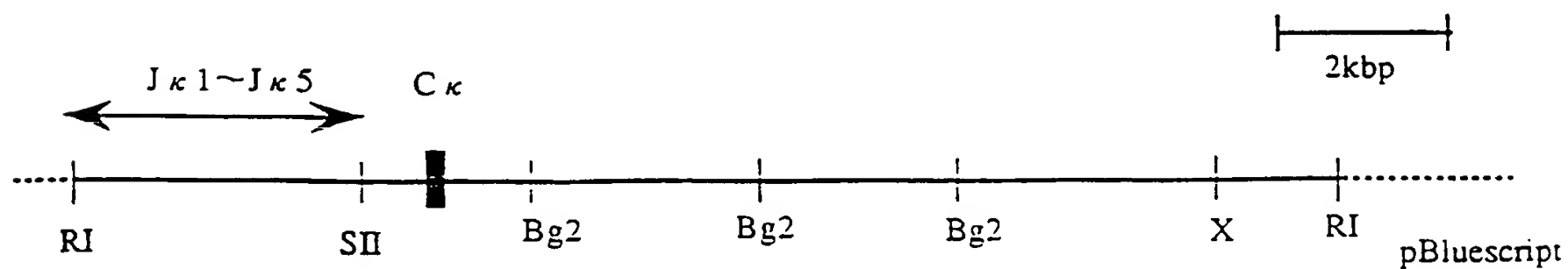




図 26

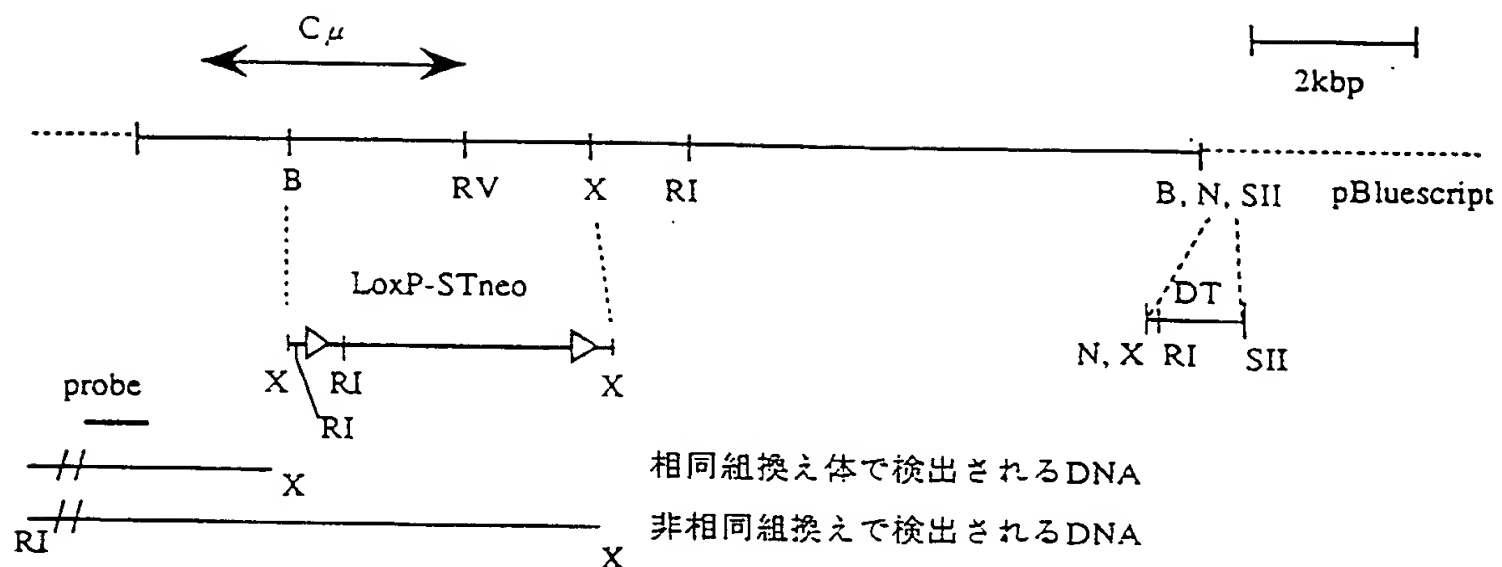
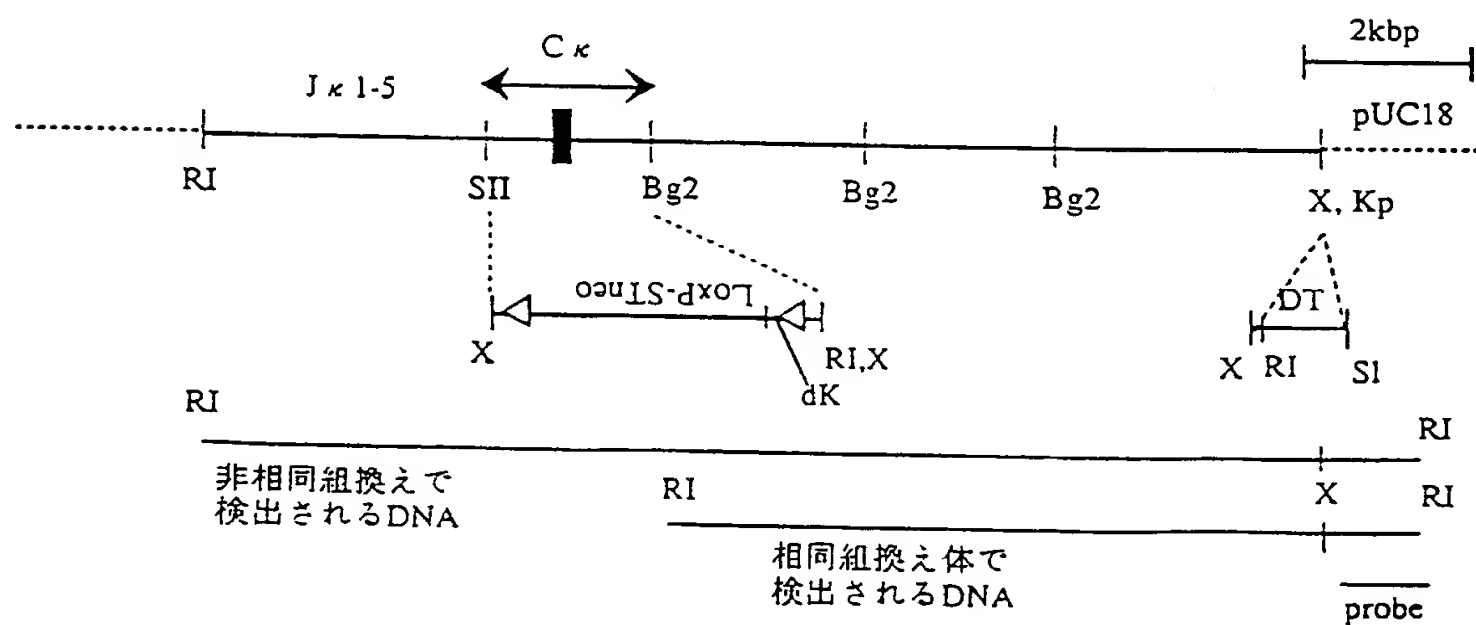


図 27







28

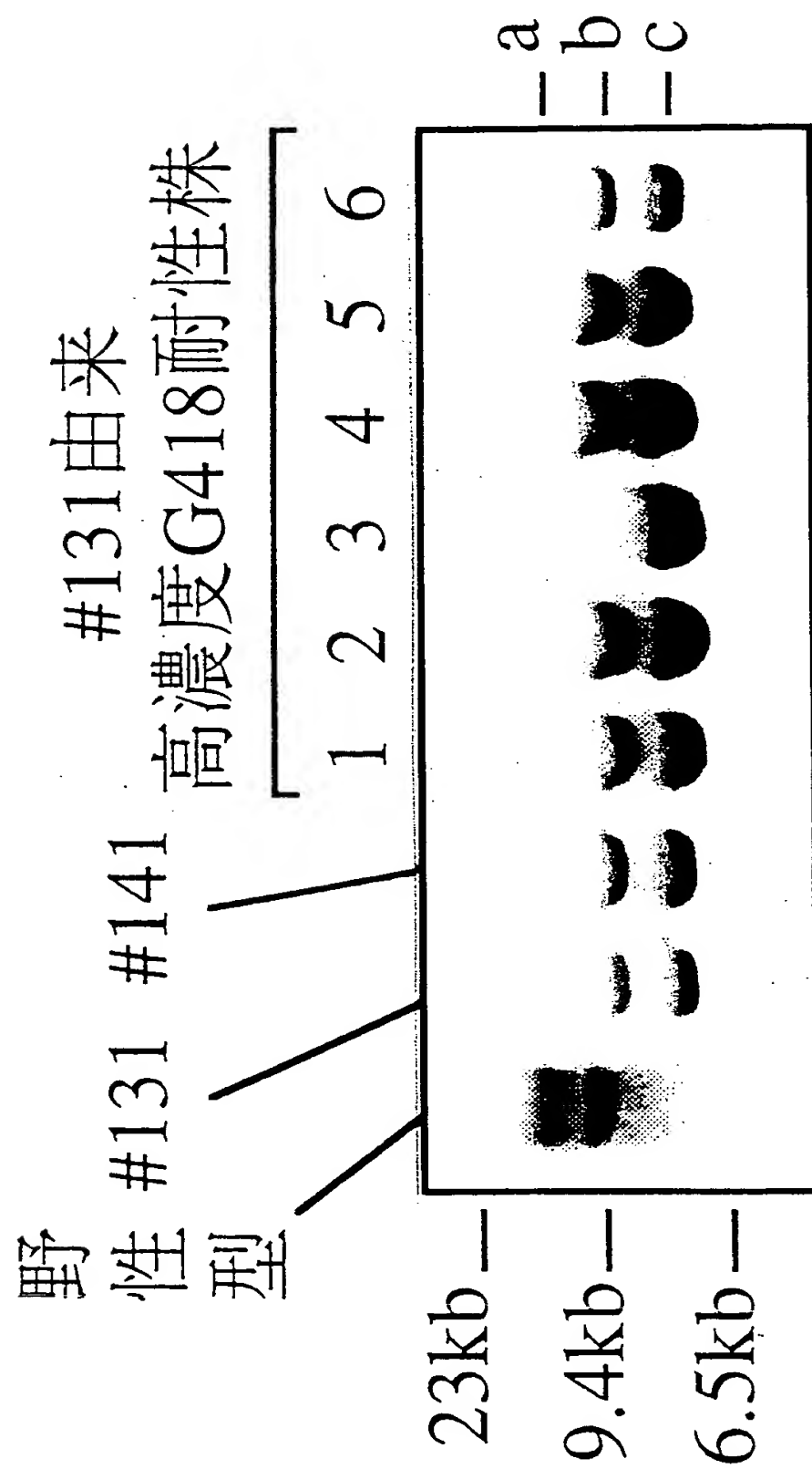




図 29

形質転換TT2F細胞株

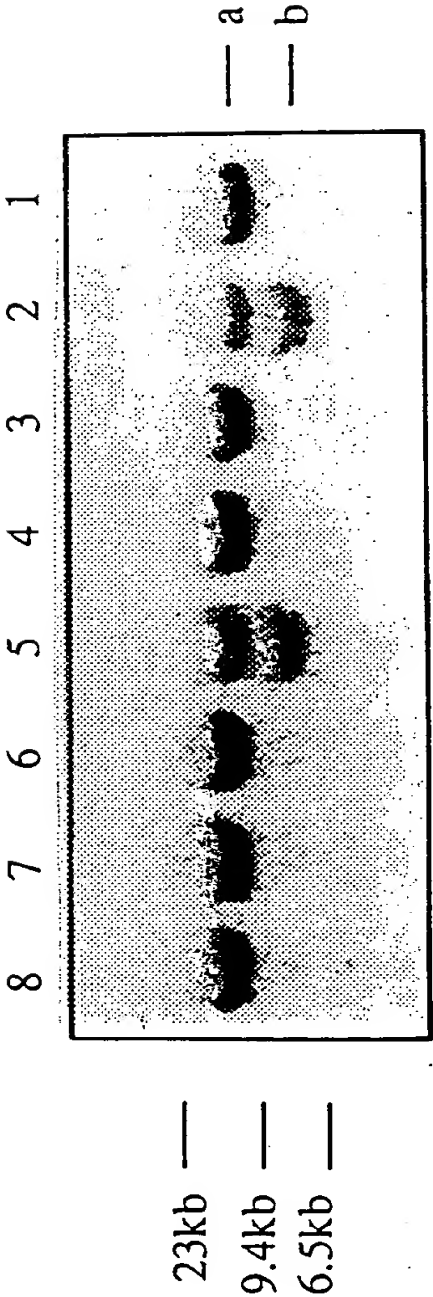




図 30

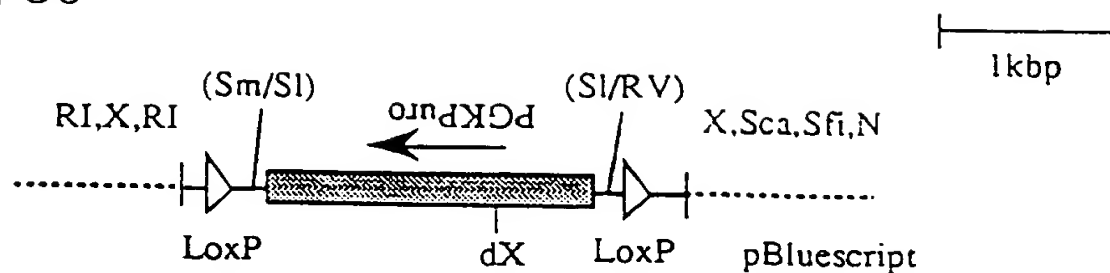
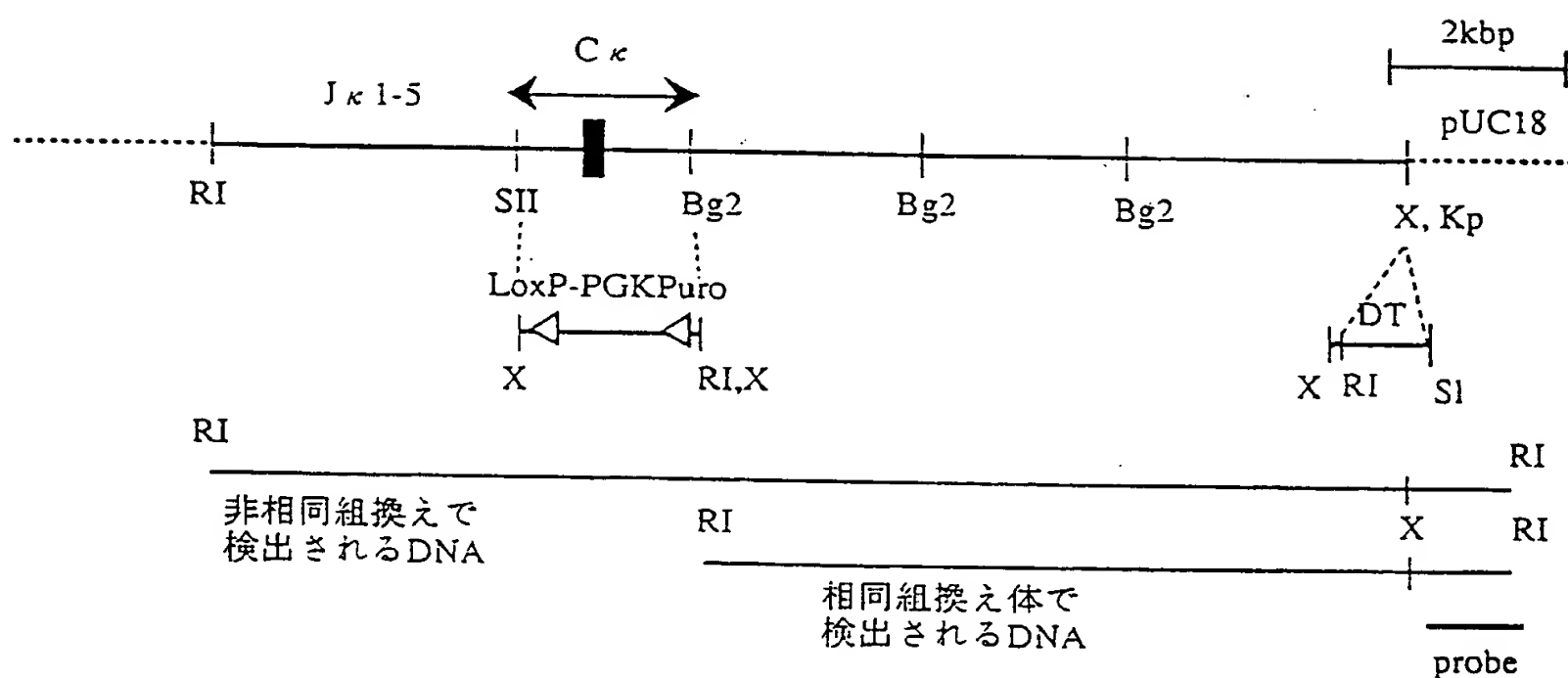


図 31



## 制限酵素：

Kp: KpnI, B: BamHI, Bg2: Bgl2, RI: EcoRI, RV: EcoRV, N: Not, SI: SalI, Sca: ScaI, Sfi: SfiI, Sm: SmaI, X: XhoI, (X): ラムダベクター由来のXhoI切断部位,  
dK: KpnI切断部位を消失, dX: XhoI切断部位を消失,  
(Sm/SI): SalI平滑化後SmaI切断部位と結合, (SI/RV): SalI平滑化後EcoRV切断部位と結合  
点線部分: pBluescript SKII(+) またはpUC18プラスミドDNA

◁▷ : LoxP配列



図 32

高濃度G418耐性TT2F細胞株

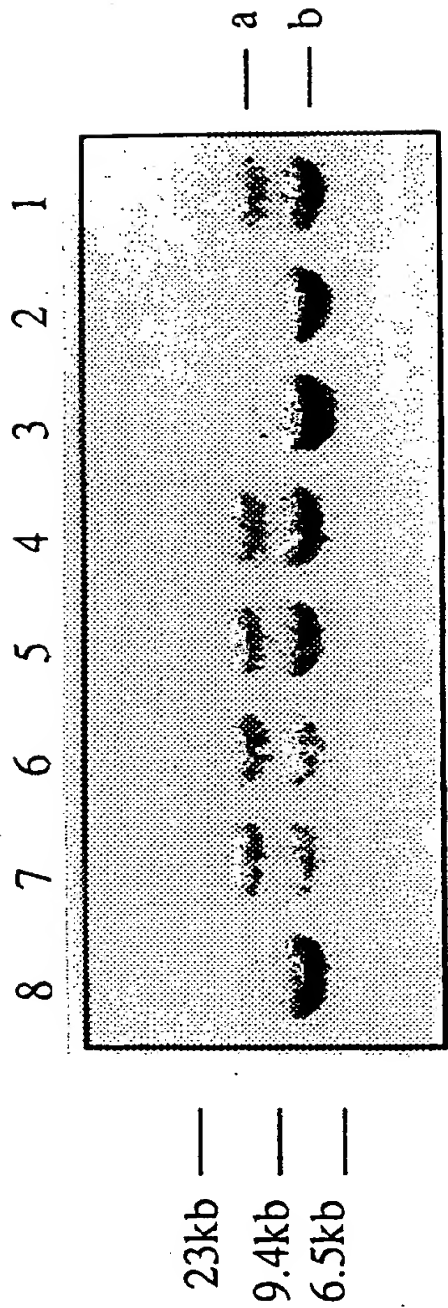






図 33

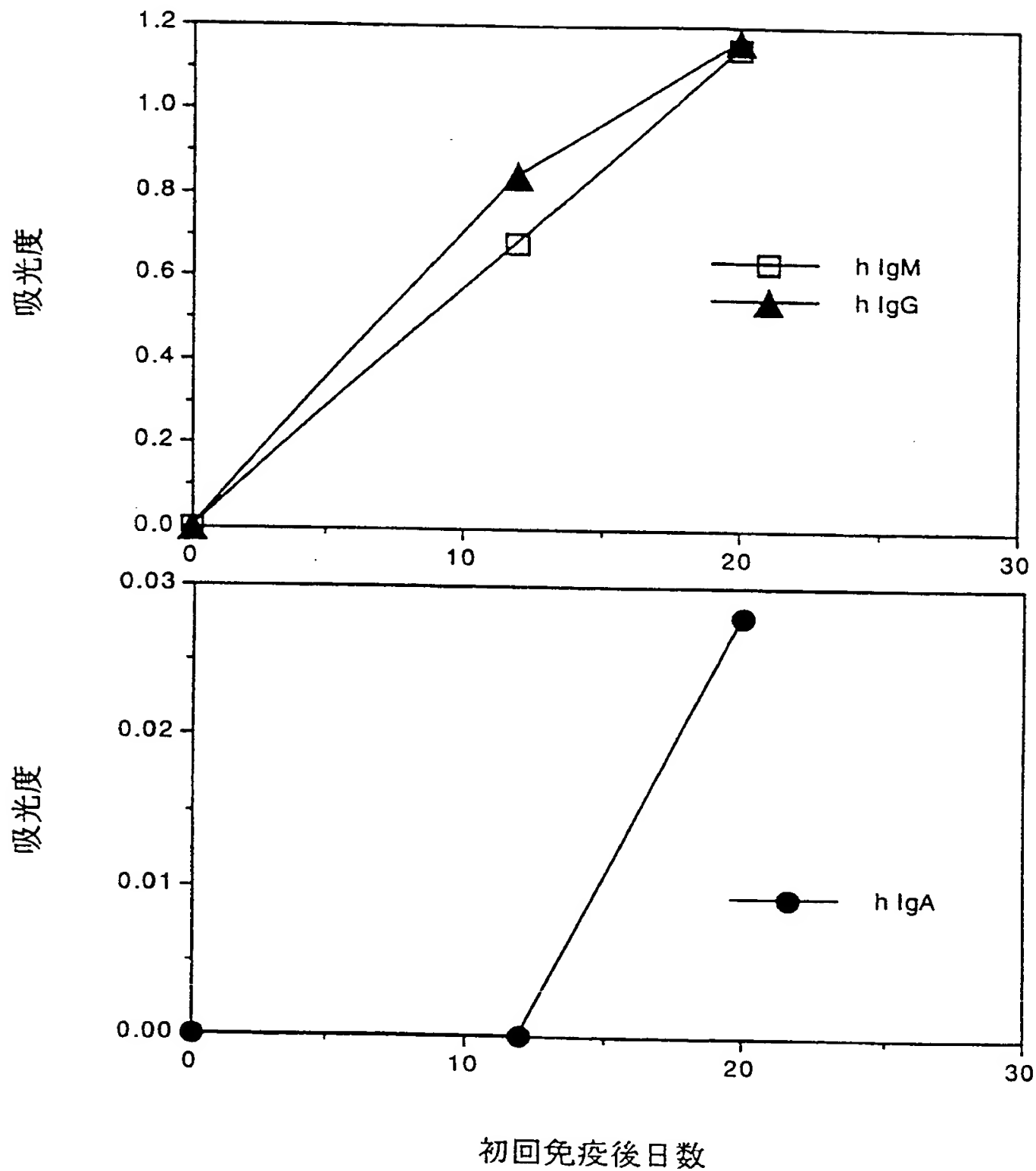






図 34



図 35

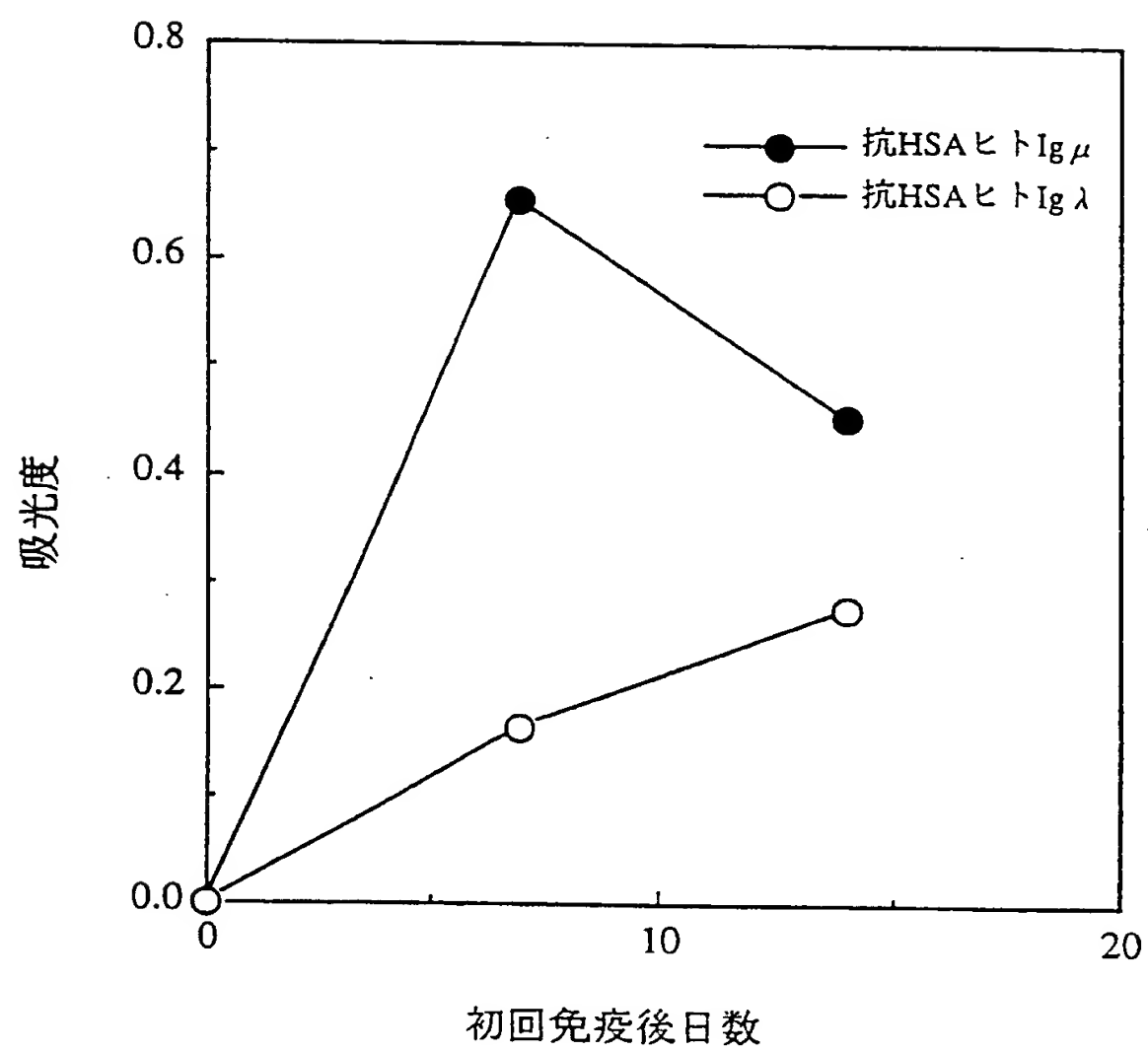






図 36





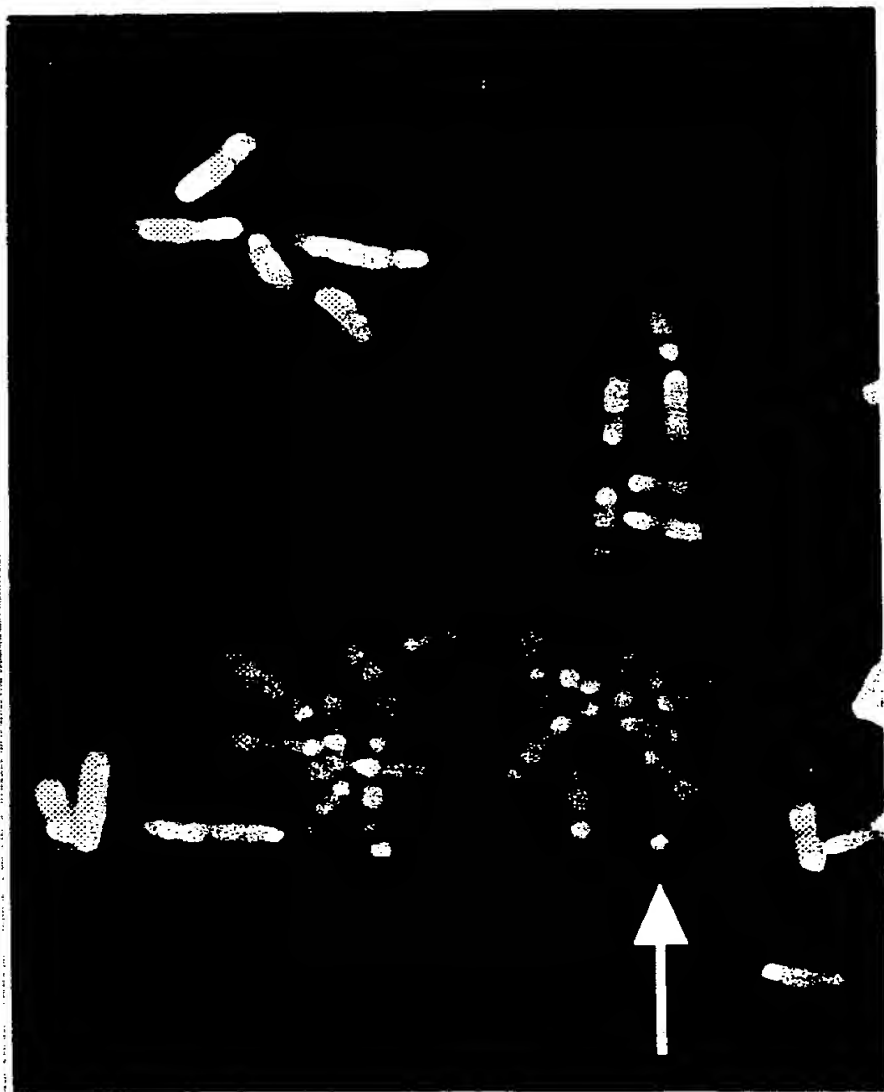


図 37

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 74

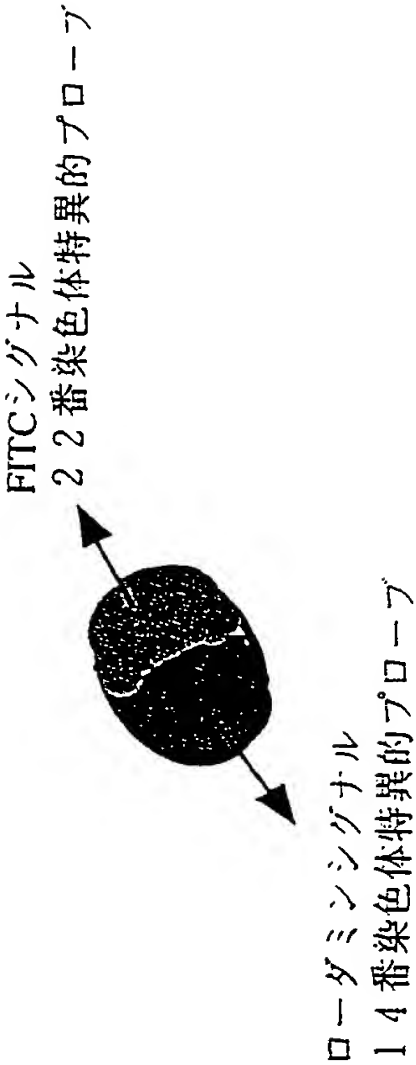
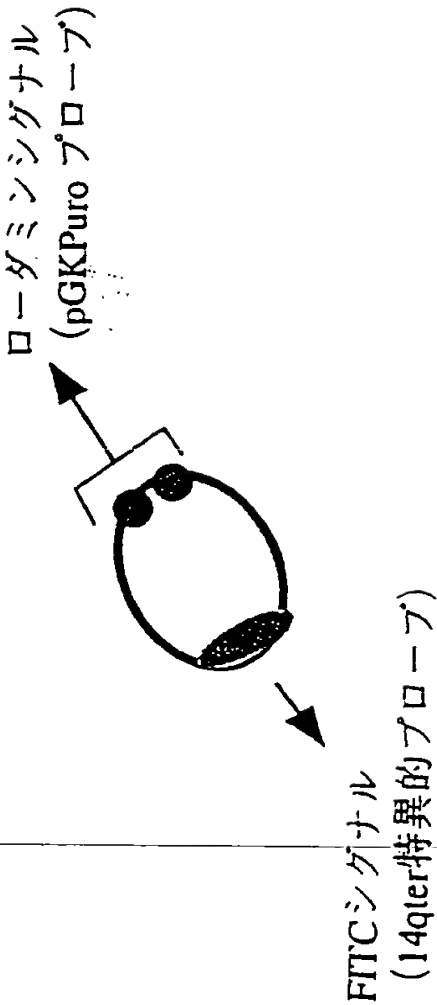
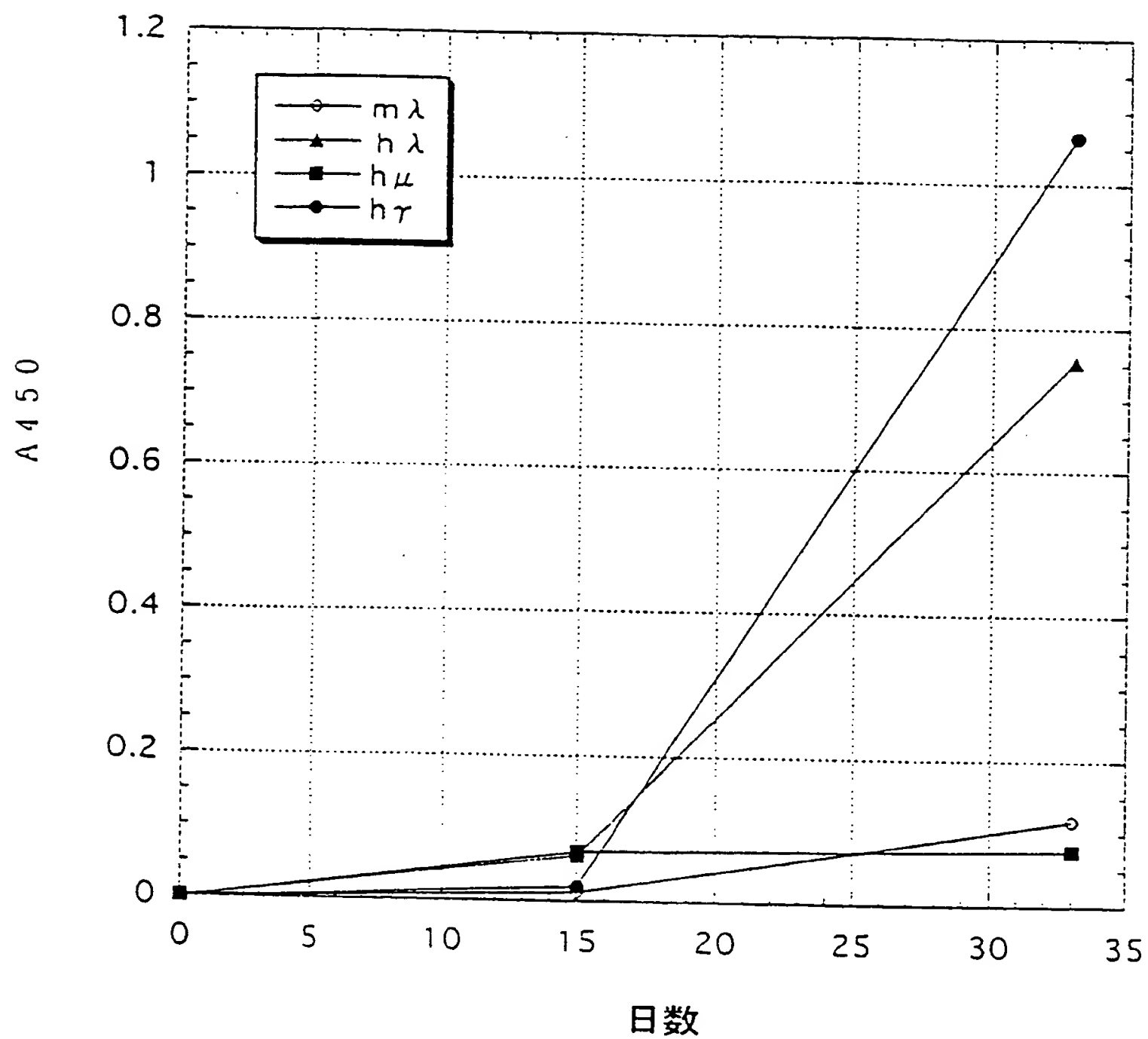




図 75





## SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> Method for Modifying Chromosomes or Fragments Thereof

<130> PH-681-PCT

<150> JP 10-236169

<151> 1998-08-21

<160> 108

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 1

tggaaggtgg ataacgccct

20

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 2

tcattctcct ccaacattag ca

22

<210> 3





<211> 20  
<212> DNA  
<212> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 3  
gcaatcggtc tgccggaaga 20

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<212> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 4  
ttggatcact ttggacccag 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<212> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 5  
ctctcctgca gggccagtca 20

<210> 6  
<211> 22  
<212> DNA  
<212> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 6

tgctgatggt gagagtgaac tc

22

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 7

agtcagggca ttagcagtgc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 8

gctgctgatg gtgagagtga

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 9

tggtggctga aagctaagaa

20



<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<212> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 10  
ccagaagaat ggtgtcatta 20

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<212> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11  
tccaggttct gcagagcaag 20

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<212> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 12  
tgtagttgga ggccatgtcc 20

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<212> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 13

ccccacccat gatccagtac

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 14

gccctcagaa gacgaagcag

20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15

gagagttgca gaaggggtga ct

22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

---

<400> 16

ggagaccacc aaaccctcca aa

22





<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 17

ggctatgggg acctgggctg

20

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 18

cagagacaca ggcacgtaga ag

22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 19

ttaagggtca cccagagact

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 20

tgtagttgga ggccatgtcc

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 21

caaaaagtcc aaccctatca

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 22

gccctcagaa gacgaagcag

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 23



tcgttcctgt cgaggatgaa

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 24

tcactccgaa gctgcctttc

20

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 25

atgtacagga tgcaactcct g

21

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 26

tcatctgtaa atccagcagt

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA



<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 27

gatcccatcg cagctaccgc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 28

ttcgccgagt agtcgcacgg

20

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 29

gatgaactag tccaggtgag tt

22

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer





<400> 30

cccttttggt tctactcctt ca

22

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 31

atagagggtta cccactctgg

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 32

aaccaggtag gttgatatgg

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 33

aagttcctgt gatgtcaagc

20

<210> 34

<211> 20



<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 34

tcatgagcag attaaacccg

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 35

tgtgaaggag gaccaggtgt

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 36

tgtaggggtt gacagtgaca

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer



<400> 37

ctgagagatg cctctggtgc

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 38

ggcggttagt ggggtcttca

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 39

ggtgtcgtgg aactcaggcg

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 40

ctggtgcagg acggtgagga

20

<210> 41



<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 41

gcacccctgac cgtgtccgaa

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 42

gggtcagtag caggtgccag

20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 43

agtgagataa gcagtggatg

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>





<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 44

gttgtgctac tcccatcact

20

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 45

ttgtatttcc aggagaaagt g

21

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 46

ggagacgagg gggaaaaggg

20

<210> 47

<211> 27

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 47

atggactgga cctggaggrrt cytctkc

27



<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 48

atggagyttg ggctgasctg gstttt

27

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 49

atgrammwac tktgkwbcwy sctyctg

27

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 50

cagaggcagt tccagatttc

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 51

tgggatagaa gttattcagc

20

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 52

atggacatgr rrdycchvgy kcasctt

27

<210> 53

<211> 28

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 53

ccaagcttca ggagaaagtg atggagtc

28

<210> 54

<211> 28

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 54

ccaagcttag gcagccaacg gccacgct

28



<210> 55

<211> 28

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 55

ccaagcttca gaggcagttc cagatttc

28

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 56

gggaattcgg gtagaagtca ctgatcag

28

<210> 57

<211> 28

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 57

gggaattcgg gtagaagtca cttatgag

28

<210> 58

<211> 28

<212> DNA

<212> Artificial Sequence





<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 58

gggaattcgg gtagaagtca cttacgag

28

<210> 59

<211> 60

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Probe

<400> 59

accttcacg tcctcttcct cctgagcctc ttctacagca ccaccgtcac cctgttcaag 60

<210> 60

<211> 60

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Probe

<400> 60

tgatgctgca ccaactgtat ccattctccc accatccagt gagcagttaa catctggagg 60

<210> 61

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 61



ctggggtgag ccgatgttt tg

22

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 62

ccaaccagc tcagccagt tc

22

<210> 63

<211> 36

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 63

aattccgcg ggtcgacgga tccctcgagg gtacca

36

<210> 64

<211> 36

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 64

ggcgccag ctgcctaggg agtcccatg gttcga

36

<210> 65

<211> 33

<212> DNA



<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 65

tcgaactagt aggagaagtg aacttgagga ggc

33

<210> 66

<211> 31

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 66

tcgaactagt gattcagtga tgctgtgcag g

31

<210> 67

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 67

gagagttgca gaaggggtga ct

22

<210> 68

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer



<400> 68

ggagaccacc aaaccctcca aa

22

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 69

gagctgcaag aactcttcct cacg

24

<210> 70

<211> 28

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 70

atgactctaa ggcaggaaca tctgtacc

28

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 71

ctgcgtgtgt aatcgtgtcc

20

---

<210> 72

<211> 20





<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 72

tctgctgtga gtgaacctgc

20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 73

aggaggcacc ttggataagc

20

<210> 74

<211> 22

<212> DNA

<212> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 74

tcactctgac ccacgataca gc

22

<210> 75

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Sfi I linker



<400> 75

ggccgcwgcg gcc

13

<210> 76

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 76

tcgaggtacc gtgagaacaa gacagagaat gagggagg

38

<210> 77

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 77

tcgaggtacc taatgcagag gctctttggt gtacttgg

38

<210> 78

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 78

tcgagaattc agtagctggc actatctttt tggccatc

38

<210> 79



<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 79

tcgagaattc ggagaaagaa cacacaagga ctcggtc

37

<210> 80

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 80

gcccgggc

8

<210> 81

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 81

tcgaggatcc gatagagaga ttgtcttaaa tgggtggg

38

<210> 82

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 82

tcgaggatcc aacagctgga actcataaaa gcatagc

37

<210> 83

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 83

tcgaggatcc ctttagtgaa ggcaaaggaa gggacactc

39

<210> 84

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 84

tcgaggatcc tgtaaagggg tagcctgtcc tctttcatg

39

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 85

cacatgacaa gagctcagcg

20





<210> 86  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 86  
tctgacttcc tcatgagagc c 21

<210> 87  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 87  
tggatgtatc ctgtcaagag acc 23

<210> 88  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 88  
cagacactct atgcctgtgt gg 22

<210> 89  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 89

gccctcatgg aaatctcctg gg

22

<210> 90

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 90

gcagcaacag atggaaggcc tc

22

<210> 91

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 91

gaacagaaag ccactcttgc ttccat

27

<210> 92

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 92

accgagctgc aagaactctt cctcac

26



<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 93

ctctcctgca gggccagtca

20

<210> 94

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 94

tgctgatggt gagagtgaac tc

22

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 95

tggaagggtgg ataacgccct

20

<210> 96

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 96

tcattctcct ccaacattag ca

22

<210> 97

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 97

tcctcttttt ccttcctttg cctc

24

<210> 98

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 98

attattttgg gcgttgcggtg g

21

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 99





agtgagataa gcagtggatg

20

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 100

gttgtgctac tcccatcact

20

<210> 101

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 101

gagagttgca gaaggggtga ct

22

<210> 102

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 102

ggagaccacc aaaccctcca aa

22

<210> 103

<211> 20

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 103

atagcagctt tgctccttcg

20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 104

ttctctcctg cacatagccc

20

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 105

agtgagataa gcagtggatg

20

<210> 106

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer



<400> 106

gttgtgctac tcccatcact

20

<210> 107

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 107

tggaaggtgg ataacgccct

20

<210> 108

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 108

tcattctcct ccaacattag ca

22

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 ～ 5 8 および 6 1 ～ 7 4 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 5 9 および 6 0 は、プローブの塩基配列を示す。

配列番号 7 5 は、Sfi I リンカーの塩基配列を示す。

配列番号 7 6 ～ 7 9 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 8 0 は、Srf I リンカーの塩基配列を示す。

配列番号 8 1 ～ 1 0 8 は、プライマーの塩基配列を示す。



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04518

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A01K 67/027, C12N 5/10, C12N 15/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A01K 67/027, C12N 5/10, C12N 15/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), JOIS (JICST)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Tomizuka K., et al., Nature Genetics, vol.16, p.133-143 (1997)	68,70 26-67,69,71-83
X Y	WO, 97/07671, A1 (Kirin Brewery Company, limited), 06 March, 1997 (06.03.97) & AU, 6837696, A1 & EP, 843961, A1	68,70 26-67,69,71-83
Y	Dieken E.S. et al., Nature Genetics, vol.12, p.174-182 (1996)	1-92
Y	Smith A.J.H. et al., Nature Genetics, vol.8, p.376-385 (1995)	1-92
Y	Willmut et al., Nature, vol.385, p.810 (1997)	46-67
A	Ramirez-Solis R. et al., Nature, vol.378, p.720-724 (1995)	1-92
A	Mills W. et al., Human Mol.Gen., vol.8, p.751-761 (1999)	1-92

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 November, 1999 (15.11.99)

Date of mailing of the international search report  
24 November, 1999 (24.11.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04518

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 98/54348, A1 (Bruggrmann M.), 03 December, 1998 (03.12.98) & GB, 97-11167, A1 & AU, 7667698, A1	1-92
A	WO, 97/49804, A1 (Baylor College of Medicine), 31 December, 1997 (31.12.97) & AU, 3507297, A1 & EP, 907726, A1	1-92



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>6</sup> A01K 67/027, C12N 5/10, C12N 15/06		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>6</sup> A01K 67/027, C12N 5/10, C12N 15/06		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS (DIALOG), JOIS (JICSTファイル)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Tomizuka K., et al., Nature Genetics, vol.16, p.133-143 (1997)	68, 70 26-67, 69, 71-83
X Y	WO, 97/07671, A1 (麒麟麦酒株式会社), 06.3月.1997 (06.03.97) & AU, 6837696, A1 & EP, 843961, A1	68, 70 26-67, 69, 71-83
Y	Dieken E.S. et al., Nature Genetics, vol.12, p.174-182 (1996)	1-92
Y	Smith A.J.H. et al., Nature Genetics, vol.8, p.376-385 (1995)	1-92
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15.11.99	国際調査報告の発送日 24.11.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 長井 啓子 印	2B 9123
電話番号 03-3581-1101 内線 3236		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Willmut et al., Nature, vol. 385, p. 810 (1997)	46-67
A	Ramirez-Solis R. et al., Nature, vol. 378, p. 720-724 (1995)	1-92
A	Mills W. et al., Human Mol. Gen., vol. 8, p. 751-761 (1999)	1-92
A	WO, 98/54348, A1 (Bruggmann M.), 03. 12月. 1998 (03. 12. 98) & GB, 97-11167, A1 & AU, 7667698, A1	1-92
A	WO, 97/49804, A1 (Baylor College of Medicine), 31. 12月. 1997 (31. 12. 97) & AU, 3507297, A1 & EP, 907726, A1	1-92